

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 3 月 27 日 (27.03.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/025179 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/12, C07K 14/705, 16/28, C12N 5/10, A61K 38/17, 39/395, G01N 33/50, 33/15, C12P 21/02, 21/08, A01K 67/027 // (C12N 15/12, C12R 1:19) (C12N 5/10, C12R 1:91) (C12P 21/02, C12R 1:91) (C12P 21/08, C12R 1:91)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/09446
- (22) 国際出願日: 2002 年 9 月 13 日 (13.09.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2001-279232 2001 年 9 月 14 日 (14.09.2001) JP
特願2001-315148 2001 年 10 月 12 日 (12.10.2001) JP
特願2002-108621 2002 年 4 月 10 日 (10.04.2002) JP
- 特願2002-169232 2002 年 6 月 10 日 (10.06.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府 大阪市 中央区道修町四丁目 1 番 1 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 森 正明 (MORI, Masaaki) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県 つくば市 春日 3 丁目 8 番地 5 Ibaraki (JP). 林 浩三 (HAYASHI, Kozo) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県 つくば市 春日 1 丁目 7 番地 9 武田春日ハイツイ 1001 号 Ibaraki (JP). 味谷 浩之 (MIYA, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒305-0004 茨城県 つくば市 大字 柴崎 5 1 7 番地 9 Ibaraki (JP). 佐藤 秀司 (SATO, Shuji) [JP/JP]; 〒300-3261 茨城県 つくば市 花畑 3 丁目 1 9 番地 9 メルモ 301 号 Ibaraki (JP). 北田 千恵子 (KITADA, Chieko) [JP/JP]; 〒590-0073 大阪府 堺市 南

[続葉有]

(54) Title: NOVEL POLYPEPTIDE, DNA THEREOF AND USE OF THE SAME

(54) 発明の名称: 新規ポリペプチド、そのDNAおよびそれらの用途

(57) Abstract: It is intended to provide a novel polypeptide, a receptor, DNA thereof, etc. More specifically, a polypeptide capable of binding to a protein represented by SEQ ID NO:1 or 3, its amide, its ester or its salt; a polynucleotide encoding the above polypeptide; an antisense polynucleotide of the above polypeptide or its antibody; a method of screening a preventive/remedy for cancer, obesity and the like using the same, etc. The polypeptide, receptor, polynucleotide, antisense polynucleotide, antibody, etc. as described above are useful as preventives/remedies for cancer, obesity and the like. Moreover, they are useful in screening preventives/remedies for cancer, obesity and the like.

(57) 要約:

本発明は、新規ポリペプチド、レセプターおよびそのDNA等の提供を目的とする。具体的には、本発明は、配列番号：1または配列番号：3で表されるタンパク質と結合する能力を有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、該ポリペプチドのアンチセンスポリヌクレオチドまたは抗体、これらを用いる癌、肥満症などの予防・治療剤のスクリーニングなどを提供する。

本発明のポリペプチド、レセプター、ポリヌクレオチド、アンチセンスポリヌクレオチド、抗体などは、癌、肥満症などの予防・治療剤などとして有用であり、さらには、癌、肥満症などの予防・治療剤のスクリーニングなどにも有用である。



向陽町 1 丁 2 番 8 号 Osaka (JP). 松本 寛和 (MAT-SUMOTO, Hirokazu) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県 つくば市 春日 2 丁目 3 5 番地 1 0 Ibaraki (JP). 南祇 利美 (NAGI, Toshimi) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県 つくば市 春日 2 丁目 3 6-3 号棟 2 0 1 号 Ibaraki (JP). 下村 行生 (SHIMOMURA, Yukio) [JP/JP]; 〒305-0035 茨城県 つくば市 松代 3 丁目 1 2 番地 1 武田松代レジデンス 4 1 0 号 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 小林 浩, 外 (KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒104-0028 東京都 中央区 八重洲 2 丁目 8 番 7 号 福岡ビル 9 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,

OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

1

明細書

新規ポリペプチド、そのDNAおよびそれらの用途

技術分野

- 5 本発明は新規ポリペプチドおよびそれをコードするポリヌクレオチド、該新規ポリペプチドを用いた医薬のスクリーニング方法、該スクリーニングによって得られる化合物などに関する。さらには、該新規ポリペプチドが結合する新規なレセプターなどにも関する。さらには、癌の予防・治療剤、肥満の予防・治療剤などにも関する。

10

背景技術

- 生体のホメオスタシスの維持、生殖、個体の発達、代謝、成長、神経系、循環器系、免疫系、消化器系、代謝系の調節、感覚受容などの重要な機能調節は、様々なホルモンや神経伝達物質のような内在性因子あるいは光や匂いなどの感覚刺激をこれらに対して生体が備えている細胞膜に存在する特異的なレセプターを介して細胞が受容し、それに応じた反応をすることによって行われている。このような機能調節に与るホルモンや神経伝達物質のレセプターの多くは guanine nucleotide-binding protein（以下、Gタンパク質と略称する）と共役しており、このGタンパク質の活性化によって細胞内にシグナルを伝達して様々な機能を発現させることを特徴とする。また、これらのレセプタータンパク質は共通して 7 個の膜貫通領域を有する。これらのことからこうしたレセプターはGタンパク質共役型レセプターあるいは7回膜貫通型レセプターと総称される。このように生体機能の調節には様々なホルモンや神経伝達物質およびそれに対するレセプタータンパク質が存在して相互作用し、重要な役割を果たしていることがわかっているが、未知の作用物質（ホルモンや神経伝達物質など）およびそれに対するレセプターが存在するかどうかについてはいまだ不明なことが多い。

25

近年、ヒトゲノムDNAあるいは各種ヒト組織由来のcDNAのランダムな配列決定による配列情報の蓄積および遺伝子解析技術の急速な進歩によってヒトの遺伝子が加速度的に解明されてきている。それにともない、機能未知のタンパク

2

質をコードすると予想される多くの遺伝子の存在が明らかになっている。Gタンパク質共役型レセプターは、7個の膜貫通領域を有するのみでなくその核酸あるいはアミノ酸に多くの共通配列が存在するためそのようなタンパク質の中から明確にGタンパク質共役型レセプターとして区分することができる。一方でこうした構造の類似性を利用したポリメラーゼ・チェーン・リアクション (Polymerase Chain Reaction: 以下、PCRと略称する) 法によってもこうしたGタンパク質共役型レセプター遺伝子が得られている。このようにしてこれまでに得られたGタンパク質共役型レセプターのうちには既知のレセプターとの構造の相同性が高いサブタイプであって容易にそのリガンドを予測することが可能な場合もあるが、ほとんどの場合、その内在性リガンドは予測不能であり、これらのレセプターは対応するリガンドが見いだされていない。このことからこれらのレセプターはオーファンレセプターと呼ばれている。このようなオーファンレセプターの未同定の内在性リガンドは、リガンドが知られていなかったために十分な解析がなされていなかった生物現象に関与している可能性がある。そして、このようなりガンドが重要な生理作用や病態と関連している場合には、そのレセプター作動薬あるいは拮抗薬の開発が革新的な医薬品の創製に結びつくことが期待される (Stadel, J. et al., *TiPS*, 18巻、430-437頁、1997年、Marchese, A. et al., *TiPS*, 20巻、370-375頁、1999年、Civelli, O. et al., *Brain Res.*, 848巻、63-65頁、1999年)。しかし、これまで実際にオーファンGタンパク質共役型レセプターのリガンドを同定した例はそれほど多くない。

最近、幾つかのグループによってこうしたオーファンレセプターのリガンド探索の試みがなされ、新たな生理活性ペプチドであるリガンドの単離・構造決定が報告されている。ReinsheidらおよびMeunierらは独立に、動物細胞にオーファンGタンパク質共役型レセプターLC132あるいはORL1をコードするcDNAを導入してレセプターを発現させ、その応答を指標としてorphanin FQあるいはnociceptinと名付けられた新規ペプチドをブタ脳あるいはラット脳の抽出物より単離し、配列を決定した (Reinsheid, R. K. et al., *Science*, 270巻、792-794頁、1995年、Meunier, J.-C. et al., *Nature*, 377巻、532-535頁、1995年)。このペプチドは痛覚に関与していることが報告されたが、さらに、レセプター

3

のノックアウトマウスの研究により記憶に関与していることが明らかにされた (Manabe, T. et al., Nature, 394巻、577-581頁、1998年)。

その後これまでに上記と同様な方法により P r R P (prolactin releasing peptide)、orexin、apelin、ghrelin、G A L P (galanin-like peptide) およ
5 びmetastinなどの新規ペプチドがオーファンGタンパク質共役型レセプターのリ
ガンドとして単離された (Hinuma, S. et al., Nature, 393巻、272-276頁、
1998年、Sakurai, T. et al., Cell, 92巻、573-585頁、1998年、Tatemoto, K.
et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 251巻、471-476頁、1998年、Kojima,
M. et al., Nature, 402巻、656-660頁、1999年、Ohtaki, T. et al., J. Biol.
10 Chem., 274巻、37041-37045頁、1999年、Ohtaki, T. et al., Nature, 411巻、
613-617頁、2001年)。これらの新規ペプチドのうち、これまでにorexinは摂食
および睡眠に関与すること (Sakurai, T. et al., Cell, 92巻、573-585頁、
1998年、Lin, L. et al., Cell, 98巻、365-376頁、1999年、Chemelli, R. M.
et al., Cell, 98巻、437-451頁、1999年)、またghrelinは摂食亢進活性を示す
15 ことが報告された (Tschop, M. et al., Nature, 407巻、908-913頁、2000年、
Nakazato, M. et al., Nature, 409巻、194-198頁、2001年)。さらに、
metastinはガン転移を抑制する可能性が示唆されている (Ohtaki, T. et al.,
Nature, 411巻、613-617頁、2001年)。

一方、これまで明らかでなかった生理活性ペプチドのレセプターが同様な方法
20 によって解明される場合もある。腸管収縮に関与するmotilinのレセプターが
GPR38であることが明らかにされた (Feighner, S. D. et al., Science, 284巻
、2184-2188頁、1999年) ほか、MCHのレセプターとしてS L C - 1 (MCH
R 1) (Chambers, J. et al., Nature, 400巻、261-265頁、1999年、Saito, Y.
et al., Nature, 400巻、265-269頁、1999年、Shimomura, Y. et al., Biochem.
25 Biophys. Res. Commun., 261巻、622-626頁、1999年、Lembo, P. M. C. et al.
、Nature Cell Biol., 1巻、267-271頁、1999年、Bachner, D. et al., FEBS
Lett., 457巻、522-524頁、1999年) およびSLT (MCHR2) (Mori, M. et al.,
Biochem. Biophys. Res. Commun., 283巻、1013-1018頁、2001年、Hill, J. et
al., J. Biol. Chem., 276巻、20125-20129頁、2001年、Sailer, A. W. et al.

- 、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、98巻、7564-7569頁、2001年、An, S. et al.、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、98巻、7576-7581頁、2001年）が同定され、またGPR14（SENr）がurotensin IIのレセプターであること（Ames, R. S. et al.、Nature、401巻、282-286頁、1999年、Mori, M. et al.、Biochem. Biophys. Res. Commun.、265巻、123-129頁、1999年、Nothacker, H.-P. et al.、Nature Cell Biol.、1巻、383-385頁、1999年、Liu, Q. et al.、Biochem. Biophys. Res. Commun.、266巻、174-178頁、1999年）およびFM3（GPR66）およびFM4がneuromedin Uのレセプターであること（Howard, A. D. et al.、Nature、406巻、70-74頁、2000年、Szekeres, P. G. et al.、J. Biol. Chem.、275巻、20247-20250頁、2000年、Fujii, R. et al.、J. Biol. Chem.、275巻、21068-21074頁、2000年、Hosoya, M. et al.、J. Biol. Chem.、275巻、29528-29532頁、2000年、Raddatz, R. et al.、J. Biol. Chem.、275巻、32452-32459頁、2000年、Shan, L.-X. et al.、J. Biol. Chem.、275巻、39482-39486頁、2000年、Kojima, M. et al.、Biochem. Biophys. Res. Commun.、276巻、435-438頁、2000年）が報告された。MCHはそのノックアウトマウスが羸瘦の表現型を示すことから肥満に関与することが示されていたが（Shimada, M. et al.、Nature、396巻、670-674頁、1999年）、そのレセプターが明らかにされたことにより抗肥満薬としての可能性を有するレセプター拮抗薬の探索が可能となった。また、urotensin IIはサルに静脈内投与することによって心虚血を惹起することから心循環系に強力な作用を示すことも報告されている（Ames, R. S. et al.、Nature、401巻、282-286頁、1999年）。Neuromedin Uは摂食抑制に機能することが示された（Howard, A. D. et al.、Nature、406巻、70-74頁、2000年、Kojima, M. et al.、Biochem. Biophys. Res. Commun.、276巻、435-438頁、2000年）。
- 25 このように、オーファンレセプターおよびそのリガンドは新たな生理作用に関与する場合が多く、その解明は新たな医薬品開発に結びつくことが期待されるが、オーファンレセプターのリガンド探索においては多くの困難さが伴うことが知られている。例えば、細胞に発現させたオーファンレセプターがリガンドに応答した後にいかなる2次情報伝達系が作動するかは一般に不明であり、様々な応答

系について検討する必要がある。また、リガンドの存在する組織は容易には予想されないため種々の組織抽出物を用意しなければならない。さらに、リガンドがペプチドである場合、レセプターを刺激するのに必要なリガンド量はごく低濃度で十分であるためにこのようなりガンドの生体内の存在量は極微量であることが多いことに加え、ペプチドはタンパク質分解酵素によって消化されて活性を失なったり、非特異的吸着によって精製過程において回収が悪かったりするために、生体より抽出して構造決定に必要な量を単離することは通常極めて困難である。これらの問題によって、これまでに数多くのオーファンレセプターの存在が明らかにされながらそのリガンドが明らかにされたレセプターはごく一部に過ぎない

10

。新たなGタンパク質共役型レセプターのリガンドを見出し、該リガンドを直接利用する、または該リガンドを用いた医薬のスクリーニング系を利用することによって今までにない全く新規な作用機序を有する医薬の開発が望まれている。

15 発明の開示

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、ヒト結腸ガン由来の配列番号：1または配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有するオーファンGタンパク質共役型レセプターと結合する内因性リガンドを見出し、精製することに成功した。さらに、この内因性リガンドが結合する新規なレセプターを取得した。これらの知見に基づいて、さらに研究を重ね発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

(1) 配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩と結合する能力を有することを特徴とするポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

(2) 配列番号：22、配列番号：14または配列番号：31で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する上記(1)記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

6

(3) 配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23、
配列番号：49、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号
：36、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31または配列番号：3
2で表されるアミノ酸配列を含有する上記(2)記載のポリペプチド、そのアミ
5 ドもしくはそのエステルまたはその塩、

(4) 配列番号：62で表されるアミノ酸配列を含有する上記(2)記載のポリ
ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

(5) 標識した上記(4)記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエス
テルまたはその塩、

10 (6) 配列番号：19、配列番号：28または配列番号：61で表されるアミ
ノ酸配列を含有する上記(2)記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエ
ステルまたはその塩、

(7) 上記(1)記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有す
るポリヌクレオチド、

15 (8) 配列番号：41、配列番号：42、配列番号：43、配列番号：44、
配列番号：37、配列番号：38、配列番号：39、配列番号：40、配列番号
：45、配列番号：46、配列番号：47、配列番号：48または配列番号：5
0で表される塩基配列を含有する上記(7)記載のポリヌクレオチド、

(9) 配列番号：18、配列番号：27または配列番号：60で表される塩基
20 配列を含有する上記(7)記載のポリヌクレオチド、

(10) DNAである上記(7)～(9)記載のポリヌクレオチド、

(11) 上記(7)記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、

(12) 上記(11)記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

(13) 上記(12)記載の形質転換体を培養し、上記(1)記載のポリペプ
25 チドを生成・蓄積せしめることを特徴とする上記(1)記載のポリペプチド、そ
のアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法、

(14) 上記(1)記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルま
たはその塩を含有してなる医薬、

(15) 上記(7)記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬、

7

(16) 上記(7)記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断薬、
(17) 肥満症の予防・治療剤である上記(14)または(15)記載の医薬

,

(18) 肥満症の診断薬である上記(16)記載の診断薬、

5 (19) 上記(1)記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体、

(20) 上記(19)記載の抗体を含有してなる医薬、

(21) 上記(19)記載の抗体を含有してなる診断薬、

(22) 癌の予防・治療剤である上記(20)記載の医薬、

10 (23) 摂食促進剤である上記(20)記載の医薬、

(24) 癌の診断薬である上記(21)記載の診断薬、

(25) 上記(7)記載のポリヌクレオチドに相補的または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有するポリヌクレオチド、

(26) DNAである上記(25)記載のポリヌクレオチド、

15 (27) 上記(25)記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬、

(28) 癌の予防・治療剤である上記(27)記載の医薬、

(29) 摂食促進剤である上記(27)記載の医薬、

(30) 上記(1)記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする上記(1)記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(31) 標識した上記(1)記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いる上記(30)記載のスクリーニング方法、

25 (32) 上記(5)記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いる上記(30)記載のスクリーニング方法、

(33) さらに、配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いる上記(30)記載のスクリーニング方法、

8

(34) さらに、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：63、配列番号：65、配列番号：95、配列番号：97、配列番号：77、配列番号：85、配列番号：87、配列番号：89、配列番号：91、配列番号：93、配列番号：71、配列番号：75、配列番号：83、配列番号：51、配列番号：55、配列番号：69、配列番号：102または配列番号：104で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いる上記(30)記載のスクリーニング方法、

(35) 配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いる上記(33)記載のスクリーニング方法、

(36) 標識した上記(1)記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、および配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いる上記(30)記載のスクリーニング方法、

(37) 上記(5)記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、および配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いる上記(30)記載のスクリーニング方法、

(38) (i) 上記(1)記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と、配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩とを接触させた場合と、

(ii) 上記(1)記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と、配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩および試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする上記(30)記載のスクリーニング方法、

(39) (i) 上記(1)記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を、配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有する細胞に接触させた場合と、

5 (ii) 上記(1)記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩および試験化合物を、配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有する細胞に接触させた場合における、該ポリペプチドの該細胞に対する結合量または細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とする上記(38)記載のスクリーニング方法、

15 (40) (i) 上記(1)記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を、配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有する細胞の膜画分に接触させた場合と、

20 (ii) 上記(1)記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩および試験化合物を、配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有する細胞の膜画分に接触させた場合における、該ポリペプチドの該細胞の膜画分に対する結合量または細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とする上記(38)記載のスクリーニング方法、

25 (41) (i) 上記(1)記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を、上記(12)記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したタンパク質に接触させた場合と、

(ii) 上記(1)記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩および試験化合物を、上記(12)記載の形質転換体を培養することによ

10

って該形質転換体の細胞膜に発現したタンパク質に接触させた場合における、該ポリペプチドの該タンパク質に対する結合量または細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とする上記（３８）記載のスクリーニング方法、

（４２）標識した上記（１）記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いる上記（３８）～（４１）記載のスクリーニング方法、

（４３）上記（１）記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる上記（１）記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

（４４）標識した上記（１）記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有する上記（４３）記載のスクリーニング用キット、

（４５）上記（５）記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有する上記（４３）記載のスクリーニング用キット、

（４６）さらに、配列番号：１または配列番号：３で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有する上記（４３）記載のスクリーニング用キット、

（４７）さらに、配列番号：１、配列番号：３、配列番号：６３、配列番号：６５、配列番号：９５、配列番号：９７、配列番号：７７、配列番号：８５、配列番号：８７、配列番号：８９、配列番号：９１、配列番号：９３、配列番号：７１、配列番号：７５、配列番号：８３、配列番号：５１、配列番号：５５、配列番号：６９、配列番号：１０２または配列番号：１０４で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有する上記（４３）記載のスクリーニング用キット、

（４８）配列番号：３で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有する上記（４６）記載のスクリーニング用キット、

（４９）標識した上記（１）記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエ

11

ステルまたはその塩、および配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有する上記（43）記載のスクリーニング用キット、

（50）上記（5）記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、および配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有する上記（43）記載のスクリーニング用キット、

（51）配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有する細胞を含有することを特徴とする上記（46）記載のスクリーニング用キット、

（52）配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有する細胞の膜画分を含有することを特徴とする上記（46）記載のスクリーニング用キット、

（53）上記（12）記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したタンパク質を含有することを特徴とする上記（46）記載のスクリーニング用キット、

（54）上記（30）記載のスクリーニング方法または上記（43）記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる上記（1）記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、

（55）上記（30）記載のスクリーニング方法または上記（43）記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる上記（1）記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩、

（56）上記（54）記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

（57）上記（55）記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

（58）肥満症の予防・治療剤である上記（56）記載の医薬、

12

(59) 癌の予防・治療剤である上記(57)記載の医薬、

(60) 摂食促進剤である上記(57)記載の医薬、

(61) 配列番号：63、配列番号：65、配列番号：95、配列番号：102または配列番号：104で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩、

(62) 上記(61)記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩、

(63) 上記(62)記載のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、

(64) DNAである上記(63)記載のポリヌクレオチド、

10 (65) 配列番号：64、配列番号：66、配列番号：96、配列番号：99、配列番号：100、配列番号：103または配列番号：105で表される塩基配列を含有する上記(64)記載のポリヌクレオチド、

(66) 配列番号：101で表される塩基配列を含有するポリヌクレオチド、

15 (67) 配列番号：85、配列番号：87、配列番号：89、配列番号：91または配列番号：93で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩、

(68) 上記(67)記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩、

(69) 上記(67)記載のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、

20 (70) DNAである上記(69)記載のポリヌクレオチド、

(71) 配列番号：86、配列番号：88、配列番号：90、配列番号：92または配列番号：94で表される塩基配列を含有する上記(70)記載のポリヌクレオチド、

25 (72) 配列番号：75または配列番号：83で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩、

(73) 上記(72)記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩、

(74) 上記(72)記載のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、

(75) DNAである上記(74)記載のポリヌクレオチド、

(76) 配列番号：76または配列番号：84で表される塩基配列を含有する上記(75)記載のポリヌクレオチド、

(77) 上記(63)、(69)または(74)記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、

5 (78) 上記(70)記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

(79) 上記(78)記載の形質転換体を培養し、上記(61)、(67)もしくは(71)記載のタンパク質またはその部分ペプチドを生成・蓄積せしめることを特徴とする上記(61)、(67)もしくは(71)記載のタンパク質またはその部分ペプチドまたはその塩の製造法、

10 (80) 上記(61)、(67)もしくは(71)記載のタンパク質またはその部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬、

(81) 上記(63)、(66)、(69)または(74)記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬、

15 (82) 上記(63)、(66)、(69)または(74)記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断薬、

(83) 肥満症の予防・治療剤である上記(80)または(81)記載の医薬、

(84) 肥満症の診断薬である上記(82)記載の診断薬、

20 (85) 配列番号：1もしくは配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：51、配列番号：55もしくは配列番号：69で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質、もしくはその部分ペプチド、またはその塩を含有してなる肥満症の予防・治療剤、

25 (86) 配列番号：1もしくは配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：51、配列番号：55もしくは配列番号：69で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質、もしくはその部分ペプチド、またはその塩をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを含有してなる肥満症の予防・治療剤、

(87) 配列番号：1もしくは配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一

14

もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：51、配列番号：55もしくは配列番号：69で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質、もしくはその部分ペプチド、またはその塩をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを含有してなる肥満症の診断薬、

- 5 (88) 上記(61)、(67)もしくは(71)記載のタンパク質またはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、

(89) 上記(88)記載の抗体を含有してなる医薬、

(90) 上記(88)記載の抗体を含有してなる診断薬、

(91) 癌の予防・治療剤である上記(89)記載の医薬、

- 10 (92) 摂食促進剤である上記(89)記載の医薬、

(93) 癌の診断薬である上記(90)記載の診断薬、

(94) 配列番号：1もしくは配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：51、配列番号：55もしくは配列番号：69で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質、もしくはその部分ペプチド、またはその塩に対する抗体を含有してなる癌の予防・治療剤、

- 15 (95) 配列番号：1もしくは配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：51、配列番号：55もしくは配列番号：69で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質、もしくはその部分ペプチド、またはその塩に対する抗体を含有してなる摂食促進剤、

- 20 (96) 配列番号：1もしくは配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：51、配列番号：55もしくは配列番号：69で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質、もしくはその部分ペプチド、またはその塩に対する抗体を含有してなる癌の診断薬、

- 25 (97) 上記(63)、(66)、(69)または(74)記載のポリヌクレオチドに相補的または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有するポリヌクレオチド、

(98) DNAである上記(97)記載のポリヌクレオチド、

(99) 上記(97)記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬、

(100) 癌の予防・治療剤である上記(99)記載の医薬、

(101) 摂食促進剤である上記(99)記載の医薬、

- 5 (102) 配列番号：1もしくは配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：51、配列番号：55もしくは配列番号：69で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質、もしくはその部分ペプチド、またはその塩をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドに、相補的または実質的に相補的な塩基配列
- 10 またはその一部を有するポリヌクレオチドを含有してなる癌の予防・治療剤、

(103) 配列番号：1もしくは配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：51、配列番号：55もしくは配列番号：69で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質、もしくはその部分ペプチド、またはその塩をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドに、相補的または実質的に相補的な塩基配列

15 またはその一部を有するポリヌクレオチドを含有してなる摂食促進剤、

(104) 上記(7)記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする上記(1)記載のポリペプチドの遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

- 20 (105) 上記(7)記載のポリヌクレオチドを含有することを特徴とする上記(1)記載のポリペプチドの遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

- (106) 上記(104)記載のスクリーニング方法または上記(105)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる上記(1)記載のポリペプチド
- 25 の遺伝子の発現を促進する化合物またはその塩、

(107) 上記(104)記載のスクリーニング方法または上記(105)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる上記(1)記載のポリペプチドの遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩、

(108) 上記(106)記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

16

- (1 0 9) 上記(1 0 7) 記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、
(1 1 0) 肥満症の予防・治療剤である上記(1 0 8) 記載の医薬、
(1 1 1) 癌の予防・治療剤である上記(1 0 9) 記載の医薬、
(1 1 2) 摂食促進剤である上記(1 0 9) 記載の医薬、
5 (1 1 3) 外来性の上記(1 0) 記載のポリヌクレオチドまたはその変異DNAを有するトランスジェニック非ヒト哺乳動物、
(1 1 4) 非ヒト動物がゲッ歯動物である上記(1 1 3) 記載の動物、
(1 1 5) ゲッ歯動物がマウスまたはラットである上記(1 1 4) 記載の動物、
、
10 (1 1 6) 外来性の上記(1 0) 記載のポリヌクレオチドまたはその変異DNAを含有し、非ヒト動物において発現しうる組換えベクター、
(1 1 7) 上記(1 1 3) 記載の動物を用いることを特徴とする上記(1 0) 記載のポリヌクレオチドの欠損・損傷に起因する疾病に対して効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法、
15 (1 1 8) 上記(1 0) 記載のポリヌクレオチドが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、
(1 1 9) ポリヌクレオチドがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化された上記(1 1 8) 記載の胚幹細胞、
(1 2 0) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である上記(1 1 9) 記載の胚幹細胞
20 、
(1 2 1) 上記(1 0) 記載のポリヌクレオチドが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、
(1 2 2) ポリヌクレオチドがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が上記(1 0) 記載のポリヌクレオチドに対するプロモーターの制御下で発現しうる上記(1 2 1) 記載の非ヒト哺乳動物、
25 (1 2 3) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である上記(1 2 1) 記載の非ヒト哺乳動物、
(1 2 4) ゲッ歯動物がマウスまたはラットである上記(1 2 3) 記載の動物、
、

17

(1 2 5) 上記(1 2 2)記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする上記(1 0)記載のポリヌクレオチドに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

- 5 (1 2 6) 上記(1 2 1)記載の動物を用いることを特徴とする肥満の予防・治療剤のスクリーニング方法、

(1 2 7) 上記(6 3)、(6 9)または(7 4)記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする上記(6 1)、(6 7)または(7 2)記載のタンパク質の遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

10

(1 2 8) 上記(6 3)、(6 9)または(7 4)記載のポリヌクレオチドを含有することを特徴とする上記(6 1)、(6 7)または(7 2)記載のタンパク質の遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

15

(1 2 9) 上記(1 2 7)記載のスクリーニング方法または上記(1 2 8)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる上記(6 1)、(6 7)または(7 2)記載のタンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の発現を促進する化合物またはその塩、

20

(1 3 0) 上記(1 2 7)記載のスクリーニング方法または上記(1 2 8)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる上記(6 1)、(6 7)または(7 2)記載のタンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の発現を阻害する化合物またはその塩、

25

(1 3 1) 上記(1 2 9)記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(1 3 2) 上記(1 3 0)記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(1 3 3) 肥満症の予防・治療剤である上記(1 3 1)記載の医薬、

(1 3 4) 癌の予防・治療剤である上記(1 3 2)記載の医薬、

(1 3 5) 摂食促進剤である上記(1 3 2)記載の医薬、

(1 3 6) 外来性の上記(6 4)、(7 0)または(7 5)記載のポリヌクレオチドまたはその変異DNAを有するトランスジェニック非ヒト哺乳動物、

18

(1 3 7) 非ヒト動物がゲッ歯動物である上記(1 3 6)記載の動物、

(1 3 8) ゲッ歯動物がマウスまたはラットである上記(1 3 7)記載の動物

、

5 (1 3 9) 外来性の上記(6 4)、(7 0)または(7 5)記載のポリヌクレオチドまたはその変異DNAを含有し、非ヒト動物において発現しうる組換えベクター、

(1 4 0) 上記(1 3 6)記載の動物を用いることを特徴とする上記(6 4)、(7 0)または(7 5)記載のポリヌクレオチドの欠損・損傷に起因する疾病に対して効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

10 (1 4 1) 配列番号：1、配列番号：3、配列番号：6 3、配列番号：6 5、配列番号：9 5、配列番号：9 7、配列番号：1 0 2、配列番号：1 0 4、配列番号：7 7、配列番号：8 5、配列番号：8 7、配列番号：8 9または配列番号：7 5で表わされるアミノ酸配列の第1 6 0番目のG l uの直前に一アミノ酸が挿入されたアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩、

15 (1 4 2) 一アミノ酸がアラニンである(1 4 1)記載のタンパク質またはその塩、

(1 4 3) 上記(1 4 1)記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩、

(1 4 4) 上記(1 4 1)もしくは(1 4 2)記載のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、

20 (1 4 5) 上記(1 4 1)記載のタンパク質もしくはその部分ペプチド、またはその塩を含有してなる癌の予防・治療剤、

(1 4 6) 配列番号：8 3、配列番号：9 1または配列番号：9 3で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質もしくはその部分ペプチド、またはその塩を含有してなる上記(1 4 5)記載の予防・治療剤、

25 (1 4 7) 上記(1 4 4)記載のポリヌクレオチドを含有してなる癌の予防・治療剤、

(1 4 8) 哺乳動物に対して、上記(5 4)記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする肥満症の予防・治療方法、

(1 4 9) 哺乳動物に対して、上記(5 5)記載の化合物またはその塩の有効

量を投与することを特徴とする癌の予防・治療方法、

(150) 肥満症の予防・治療剤を製造するための上記(54)記載の化合物またはその塩の使用、

5 (151) 癌の予防・治療剤を製造するための上記(55)記載の化合物またはその塩の使用、

(152) 上記(1)記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩を含有してなる肥満症の予防・治療剤、

10 (153) 上記(1)記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる癌の予防・治療剤または摂食促進剤、

(154) (1) 配列番号：1もしくは配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：51、配列番号：55もしくは配列番号：69で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質、もしくはその部分ペプチド、またはその塩をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドに、相補的または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有するポリヌクレオチド、(2) 上記タンパク質、もしくはその部分ペプチド、またはその塩に対する抗体、(3) 上記(141)記載のタンパク質もしくはその部分ペプチド、またはその塩、または(4) 上記(144)記載のポリヌクレオチドを含有してなるアポトーシス誘導剤、

15
20

(155) アポトーシス誘導剤である上記(20)、(27)、(57)、(89)または(99)記載の医薬などに関する。

さらに、本発明は、

(I) 配列番号：22、配列番号：14または配列番号：31で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、配列番号：22、配列番号：14または配列番号：31で表されるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列である上記(2)記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそ

25

のエステルまたはその塩、

- (II) 配列番号：22、配列番号：14または配列番号：31で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、(i) 配列番号：22、配列番号：14または配列番号：31で表されるアミノ酸配列中の1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは、1個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii) 配列番号：22、配列番号：14または配列番号：31で表されるアミノ酸配列に1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは、1個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(iii) 配列番号：22、配列番号：14または配列番号：31で表されるアミノ酸配列に1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは、1個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(iv) 配列番号：22、配列番号：14または配列番号：31で表されるアミノ酸配列中の1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは、1個）のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列、または(v) それらを組み合わせたアミノ酸配列である上記(2)記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

(III) 上記(7)記載のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、

- (IV) 上記(63)、(69)または(74)記載のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドなども提供する。

図面の簡単な説明

- 図1は、TGR23-1の疎水性プロット図である。
- 図2は、TGR23-2の疎水性プロット図である。
- 図3は、一文字表記によるTGR23-1のアミノ酸配列を示す図である。
- 図4は、一文字表記によるTGR23-2のアミノ酸配列を示す図である。
- 図5は、Wakosil-II 3C18HGカラムを用いたラットTGR23-2リガンドの最終段階の精製におけるHPLCのUV吸収と各ピークのcAMP産生促進活性

21

を示す。活性は矢印に示すピークに回収された（分画番号20）。

図6は、Wakosil-II 3C18HGカラムを用いたラットTGR23-2リガンドの最終段階の精製におけるHPLCのUV吸収と各ピークのcAMP産生促進活性を示す。活性は矢印に示すピークに回収された（分画番号22～23）。

- 5 図7は、Wakosil-II 3C18HGカラムを用いたラットTGR23-2リガンドの最終段階の精製におけるHPLCのUV吸収と各ピークのcAMP産生促進活性を示す。活性は矢印に示すピークに回収された（分画番号18）。

図8は、FLIPRを用いて測定した種々の濃度のヒトTGR23-2リガンド（1-20）によるTGR23-1発現CHO細胞の細胞内Caイオン濃度上昇活性を示す。

図9は、FLIPRを用いて測定した種々の濃度のヒトTGR23-2リガンド（1-20）によるTGR23-2発現CHO細胞の細胞内Caイオン濃度上昇活性を示す。

図10は、FLIPRを用いて測定した種々の濃度のラットTGR23-2リ
15 ガンド（1-18）のTGR23-1発現CHO細胞およびTGR23-2発現CHO細胞に対する細胞内Caイオン濃度上昇活性を示す。図中、-○-はTGR23-1発現CHO細胞および-□-はTGR23-2発現CHO細胞に対する細胞内Caイオン濃度上昇活性をそれぞれ示す。

図11は、FLIPRを用いて測定した種々の濃度のマウスTGR23-2リ
20 ガンド（1-20）のTGR23-1発現CHO細胞およびTGR23-2発現CHO細胞に対する細胞内Caイオン濃度上昇活性を示す。図中、-○-はTGR23-1発現CHO細胞および-□-はTGR23-2発現CHO細胞に対する細胞内Caイオン濃度上昇活性をそれぞれ示す。

図12は、種々の濃度のヒトTGR23-2リガンド（1-20）のフォルス
25 コリン刺激したTGR23-1発現CHO細胞およびTGR23-2発現CHO細胞に対する細胞内cAMP産生促進活性を示す。図中、-○-はTGR23-1発現CHO細胞および-□-はTGR23-2発現CHO細胞に対する細胞内cAMP産生促進活性をそれぞれ示す。

図13は、種々の濃度のヒトTGR23-2リガンド（1-20）のフォルス

コリン無添加の条件下におけるTGR23-1発現CHO細胞およびTGR23-2発現CHO細胞に対する細胞内cAMP産生促進活性を示す。図中、-○-はTGR23-1発現CHO細胞および-□-はTGR23-2発現CHO細胞に対する細胞内cAMP産生促進活性をそれぞれ示す。

5 図14は、種々の濃度のラットTGR23-2リガンド(1-18)のフォルスコリン無添加の条件下におけるTGR23-1発現CHO細胞およびTGR23-2発現CHO細胞に対する細胞内cAMP産生促進活性を示す。図中、-○-はTGR23-1発現CHO細胞および-□-はTGR23-2発現CHO細胞に対する細胞内cAMP産生促進活性をそれぞれ示す。

10 図15は、種々の濃度のヒトTGR23-2リガンド(1-20)のTGR23-1発現CHO細胞およびTGR23-2発現CHO細胞に対するアラキドン酸代謝物遊離活性を示す。図中、-○-はTGR23-1発現CHO細胞および-□-はTGR23-2発現CHO細胞に対するアラキドン酸代謝物遊離活性をそれぞれ示す。

15 図16は、種々の濃度のラットTGR23-2リガンド(1-18)のTGR23-1発現CHO細胞およびTGR23-2発現CHO細胞に対するアラキドン酸代謝物遊離活性を示す。図中、-○-はTGR23-1発現CHO細胞および-□-はTGR23-2発現CHO細胞に対するアラキドン酸代謝物遊離活性をそれぞれ示す。

20 図17は、種々の濃度のヒトTGR23-2リガンド(1-20)、ラットTGR23-2リガンド(1-18)およびマウスTGR23-2リガンド(1-20)のTGR23-2発現CHO細胞膜画分に対するGTP γ S結合促進活性を示す。図中、-○-はヒトTGR23-2リガンド(1-20)、-□-はラットTGR23-2リガンド(1-18)および-△-はマウスTGR23-2リガンド(1-20)のGTP γ S結合促進活性をそれぞれ示す。

25 図18は、TGR23-2発現CHO細胞から調製した細胞膜画分を用いた、[Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド(1-20)に対するヒトTGR23-2リガンド(1-20)、ラットTGR23-2リガンド(1-18)およびマウスTGR23-2リガンド(1-20)の結合阻害活

性を示す。図中、 \bigcirc はヒトTGR23-2リガンド(1-20)、 \square はラットTGR23-2リガンド(1-18)および \triangle はマウスTGR23-2リガンド(1-20)の結合阻害活性をそれぞれ示す。

図19は、ヒトTGR23-1およびヒトTGR23-2の癌細胞における発
5 現量のグラフである。

図20は、ヒトTGR23の癌細胞における発現量のグラフである。

図21は、ヒトTGR23-2リガンド(1-20)または蒸留水をラット側脳室内に投与
後4時間までの30分ごとの摂餌量の経時的変動を示す。図中、 \bullet はヒト
TGR23-2リガンド(1-20)投与群を、 \bigcirc は蒸留水投与群を示す。値は平均値±
10 標準誤差(n=8)で示す。*は蒸留水投与群に対して有意な($p < 0.05$)差である
ことを示す。

図22は、ヒトTGR23-2リガンド(1-20)または蒸留水をMICRO-OSMOTIC PUMPを
用いて持続投与した際のヌードマウスでのLS174Tの腫瘍サイズ経時的変動を示す。
図中、 \bullet はヒトTGR23-2リガンド(1-20)投与群を、 \bigcirc は蒸留水投与群
15 を示す。値は平均値±標準誤差(n=10)を示す。

図23は、FLIPRを用いて測定した種々の濃度のヒトTGR23-2リガ
ンド(1-20)によるヒトTGR23-1A発現CHO細胞の細胞内Caイ
オン濃度上昇活性を示す。

図24は、FLIPRを用いて測定した種々の濃度のヒトTGR23-2リガ
20 ンド(1-20)によるヒトTGR23-1B発現CHO細胞の細胞内Caイ
オン濃度上昇活性を示す。

図25は、FLIPRを用いて測定した種々の濃度のヒトTGR23-2リガ
ンド(1-20)によるヒトTGR23-1C発現CHO細胞の細胞内Caイ
オン濃度上昇活性を示す。

図26は、FLIPRを用いて測定した種々の濃度のヒトTGR23-2リガ
25 ンド(1-20)によるヒトTGR23-1D発現CHO細胞の細胞内Caイ
オン濃度上昇活性を示す。

図27は、FLIPRを用いて測定した種々の濃度のラットTGR23-2リ
ガンド(1-18)によるラットTGR23-1発現CHO細胞の細胞内Caイ

オン濃度上昇活性を示す。

図28は、FLIPRを用いて測定した種々の濃度のラットTGR23-2リガンド（1-18）によるラットTGR23-5発現CHO細胞の細胞内Caイオン濃度上昇活性を示す。

5 図29は、[Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド（1-20）のラットTGR23-1に対する解離定数を求めるためのスキャチャードプロットの図である。

10 図30は、[Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド（1-20）のラットTGR23-5に対する解離定数を求めるためのスキャチャードプロットの図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明の「配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩と結合する能力を有するポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩」としては、例えば、配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩（以下、本発明のレセプターと称する場合がある）と結合する能力を有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合の解離定数が、1 nM以下、好ましくは200 pM以下、さらに好ましくは100 pM以下、特に好ましくは80 pM以下、最も好ましくは50 pM以下であるポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩などが挙げられる。

25 本発明の配列番号：22、配列番号：14または配列番号：31で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチド（以下、本発明のポリペプチドと称する場合がある）は、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞（例えば、網膜細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β

25

細胞、骨髓細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞など）もしくはこれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、網膜、嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髓、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など、または血球系の細胞もしくはその培養細胞（例えば、MEL, M1, CTLL-2, HT-2, WEHI-3, HL-60, JOSK-1, K562, ML-1, MOLT-3, MOLT-4, MOLT-10, CCRF-CEM, TALL-1, Jurkat, CCRT-HSB-2, KE-37, SKW-3, HUT-78, HUT-102, H9, U937, THP-1, HEL, JK-1, CMK, KO-812, MEG-01など）に由来するポリペプチドであってもよく、合成ポリペプチドであってもよい。

配列番号：22で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：22で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる。

配列番号：22で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、(i) 配列番号：22で表されるアミノ酸配列中の1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは、1個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、

(ii) 配列番号：22で表されるアミノ酸配列に1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは、1個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、

26

(iii) 配列番号：22で表されるアミノ酸配列に1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは、1個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、

(iv) 配列番号：22で表されるアミノ酸配列中の1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは、1個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、および

(v) 上記(i)～(iv)を組み合わせたアミノ酸配列などもあげられる。

配列番号：22で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドとしては、例えば、前記の配列番号：22で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：22で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドと実質的に同質の活性を有するポリペプチドなどが好ましい。

実質的に同質の活性としては、例えば、本発明のポリペプチドの有する活性、例えば、後述の疾患の予防・治療活性、レセプターとの結合活性、レセプター発現細胞に対する細胞刺激活性（例、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cAMP生成抑制、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、GTP γ S結合活性、cAMP依存性プロテインキナーゼの活性化、cGMP依存性プロテインキナーゼの活性化、リン脂質依存性プロテインキナーゼの活性化、または微小管結合タンパク質リン酸化酵素（MAPキナーゼ）の活性化などを促進する活性など）、摂食抑制活性、癌増殖活性などがあげられる。実質的に同質の活性とは、それらの活性が性質的に（例、生理学的に、または薬理学的に）同質であることを示す。

配列番号：22で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列の具体例としては、例えば、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：23、配列番号：49または配列番号：62で表されるアミノ酸配列などがあげられる。

配列番号：14で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：14で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、

さらに好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる。

配列番号：14で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、(i) 配列番号：14で表されるアミノ酸配列中の1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは、1個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、

(ii) 配列番号：14で表されるアミノ酸配列に1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは、1個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、

10 (iii) 配列番号：14で表されるアミノ酸配列に1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは、1個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、

(iv) 配列番号：14で表されるアミノ酸配列中の1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは、1個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、および

(v) 上記(i)～(iv)を組み合わせたアミノ酸配列などもあげられる。

配列番号：14で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドとしては、例えば、前記の配列番号：14で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：14で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドと実質的に同質の活性を有するポリペプチドなどが好ましい。

実質的に同質の活性としては、例えば、本発明のポリペプチドの有する活性、例えば、後述の疾患の予防・治療活性、レセプターとの結合活性、レセプター発現細胞に対する細胞刺激活性（例、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cAMP生成抑制、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、GTP γ S結合活性、cAMP依存性プロテインキナーゼの活性化、cGMP依存性プロテインキナーゼの活性化、リン脂質依存性プロテインキナーゼの活性化、または微小管結合タンパク質リン酸

28

化酵素（MAPキナーゼ）の活性化などを促進する活性など）、摂食抑制活性、癌増殖活性などがあげられる。実質的に同質の活性とは、それらの活性が性質的に（例、生理学的に、または薬理学的に）同質であることを示す。

5 配列番号：14で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列の具体例としては、例えば、配列番号：12、配列番号：13または配列番号：36で表されるアミノ酸配列などがあげられる。

10 配列番号：31で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：31で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる。

15 配列番号：31で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、(i) 配列番号：31で表されるアミノ酸配列中の1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは、1個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、

(ii) 配列番号：31で表されるアミノ酸配列に1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは、1個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、

20 (iii) 配列番号：31で表されるアミノ酸配列に1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは、1個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、

(iv) 配列番号：31で表されるアミノ酸配列中の1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは、1個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、および

25 (v) 上記(i)～(iv)を組み合わせたアミノ酸配列などもあげられる。

配列番号：31で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドとしては、例えば、前記の配列番号：31で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：31で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチドと実質的に同質の活性を有するポリペプチド

などが好ましい。

実質的に同質の活性としては、例えば、本発明のポリペプチドの有する活性、例えば、後述の疾患の予防・治療活性、レセプターとの結合活性、レセプター発現細胞に対する細胞刺激活性、例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cAMP 生成抑制、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下、GTP γ S 結合活性、cAMP 依存性プロテインキナーゼの活性化、cGMP 依存性プロテインキナーゼの活性化、リン脂質依存性プロテインキナーゼの活性化、または微小管結合タンパク質リン酸化酵素（MAP キナーゼ）の活性化などを促進する活性、食抑制活性、癌増殖活性などがあげられる。実質的に同質の活性とは、それらの活性が性質的に（例、生理学的に、または薬理学的に）同質であることを示す。

配列番号：31 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列の具体例としては、例えば、配列番号：29、配列番号：30 または配列番号：32 で表されるアミノ酸配列などがあげられる。

本発明のポリペプチドの具体例としては、例えば、配列番号：22 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチド、配列番号：20 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチド、配列番号：21 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチド、配列番号：23 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチド、配列番号：49 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチド、配列番号：62 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチド、配列番号：14 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチド、配列番号：12 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチド、配列番号：13 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチド、配列番号：36 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチド、配列番号：31 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチド、配列番号：29 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチド、配列番号：30 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチド、配列番号：32 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドなどの、本発明のレセプターと特異的に結合する能力を有するポリペプチドがあげられる。

また、本発明のポリペプチドは、後述の本発明のレセプターとの結合活性、本発明のレセプター発現細胞に対する細胞刺激活性（例、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cAMP 生成抑制、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下、GTP γ S 結合活性、cAMP 依存性プロテインキナーゼの活性化、cGMP 依存性プロテインキナーゼの活性化、リン脂質依存性プロテインキナーゼの活性化、または微小管結合タンパク質リン酸化酵素（MAP キナーゼ）の活性化などを促進する活性など）などを有するポリペプチドのみならず、該結合活性または細胞刺激活性を有するポリペプチドの前駆体ポリペプチドをも包含する意味で用いられる。

該結合活性または細胞刺激活性を有するポリペプチドの前駆体ポリペプチドの具体例としては、例えば、(i) 配列番号：19 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチド、(ii) 配列番号：28 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチド、(iii) 配列番号：61 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドなどがあげられる。

具体的には、(i) 配列番号：19 で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：19 で表わされるアミノ酸配列と約 50 % 以上、好ましくは約 60 % 以上、さらに好ましくは約 70 % 以上、さらに好ましくは約 80 % 以上、さらに好ましくは約 90 % 以上、さらに好ましくは約 95 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列、(ii) 配列番号：28 で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：28 で表わされるアミノ酸配列と約 50 % 以上、好ましくは約 60 % 以上、さらに好ましくは約 70 % 以上、さらに好ましくは約 80 % 以上、さらに好ましくは約 90 % 以上、さらに好ましくは約 95 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列、(iii) 配列番号：61 で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：61 で表わされるアミノ酸配列と約 50 % 以上、好ましくは約 60 % 以上、さらに好ましくは約 70 % 以上、さらに好ましくは約 80 % 以上、さらに好ましくは約 90 % 以上、さらに好ましくは約 95 % 以上の相同性を有するアミノ酸配

列などがあげられる。

配列番号：19で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、(i) 配列番号：19で表されるアミノ酸配列中の1～15個（好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、

(ii) 配列番号：19で表されるアミノ酸配列に1～100個（好ましくは1～50個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、

(iii) 配列番号：19で表されるアミノ酸配列に1～15個（好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、

(iv) 配列番号：19で表されるアミノ酸配列中の1～15個（好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、および

(v) 上記(i)～(iv)を組み合わせたアミノ酸配列などがあげられる。

配列番号：28で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、(i) 配列番号：28で表されるアミノ酸配列中の1～15個（好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、

(ii) 配列番号：28で表されるアミノ酸配列に1～100個（好ましくは1～50個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、

(iii) 配列番号：28で表されるアミノ酸配列に1～15個（好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、

(iv) 配列番号：28で表されるアミノ酸配列中の1～15個（好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、および

(v) 上記(i)～(iv)を組み合わせたアミノ酸配列などがあげられる。

32

配列番号：61で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、(i) 配列番号：61で表されるアミノ酸配列中の1～15個（好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、

- 5 (ii) 配列番号：61で表されるアミノ酸配列に1～100個（好ましくは1～50個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、

- (iii) 配列番号：61で表されるアミノ酸配列に1～15個（好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、

(iv) 配列番号：61で表されるアミノ酸配列中の1～15個（好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、および

(v) 上記(i)～(iv)を組み合わせたアミノ酸配列などがあげられる。

- 15 上記前駆体ポリペプチドの具体例としては、例えば、配列番号：19で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチド、配列番号：28で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチド、配列番号：61で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドなどがあげられる。

- 20 本発明のポリペプチドに対するレセプターとしては、種々のレセプターのうち、本発明のポリペプチドと結合活性を有し、本発明のポリペプチドにより該レセプター発現細胞の細胞刺激活性（例、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cAMP生成抑制、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、GTP γ S結合活性、cAMP依存性
- 25 プロテインキナーゼの活性化、cGMP依存性プロテインキナーゼの活性化、リン脂質依存性プロテインキナーゼの活性化、または微小管結合タンパク質リン酸化酵素（MAPキナーゼ）の活性化などを促進する活性など）が観察されるものなどがあげられ、これらを本発明のレセプターと称する。

具体例としては、配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列

と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩などがあげられる（図3，図4）。該タンパク質は、バソトシンレセプター、メソトシンレセプター、イソトシンレセプターまたはオキシトシンレセプターにアミノ酸配列レベルで、約32～36%程度の相同性が認められる新規7回膜貫通型レセプタータンパク質である。さらには、配列番号：51で表されるアミノ酸配列を含有するGタンパク質共役型レセプタータンパク質（WO 01/18206）、配列番号：53で表されるアミノ酸配列を含有するGタンパク質共役型レセプタータンパク質（WO 01/48188）、配列番号：55で表されるアミノ酸配列を含有するGタンパク質共役型レセプタータンパク質（WO 01/48015）、配列番号：67で表されるアミノ酸配列を含有するGタンパク質共役型レセプタータンパク質（特開2001-245666）、配列番号：69で表されるアミノ酸配列を含有するGタンパク質共役型レセプタータンパク質（WO 01/96400）なども、本発明のポリペプチドに対するレセプターとして用いられる。

また、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：63、配列番号：65、配列番号：95、配列番号：97、配列番号：102、配列番号：104、配列番号：77、配列番号：85、配列番号：87、配列番号：89または配列番号：75で表わされるアミノ酸配列の第160番目のGluの直前に一アミノ酸（好ましくはAla）が挿入されたアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩（以下、本発明のレセプターAと略称することもある）なども本発明のレセプターとして用いられる。

本発明のレセプターは、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞〔例えば、網膜細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球、白血球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞（例、乳

癌細胞株（G I - 1 0 1 など）、結腸癌細胞株（C X - 1、G I - 1 1 2、C O
L O 2 0 5、L o V o、C O L O 2 0 1、S W 4 0 3、S N U - C 1、H
T - 2 9、L S 1 7 4 T、L S 1 8 0、S K - C O 1 など）、胃癌細胞株（
5 K A T O I I I など）、肺癌細胞株（L X - 1、G I - 1 1 7 など）、卵巣癌細胞
株（G I - 1 0 2 など）、前立腺癌細胞株（P C 3 など）など、またはそれら
の細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、網膜、嗅球、扁桃核、
10 大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、
膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、
大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、
15 睪丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など、または血球系の細胞もしくはその培養細胞（
例えば、M E L、M 1、C T L L - 2、H T - 2、W E H I - 3、H L - 6 0、J O S K - 1、K 5 6 2、M L - 1、M O L T - 3、
M O L T - 4、M O L T - 1 0、C C R F - C E M、T A L L - 1、J u r k a t、C C R T - H S B - 2、
K E - 3 7、S K W - 3、H U T - 7 8、H U T - 1 0 2、H 9、U 9 3 7、T H P - 1、H E L、J K - 1、C M K、
20 K O - 8 1 2、M E G - 0 1 など）に由来するタンパク質であってもよく、合成タンパク質
であってもよい。

配列番号：1 または配列番号：3 で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一の
アミノ酸配列としては、例えば、配列番号：1 または配列番号：3 で表わされる
20 アミノ酸配列と約 5 0 % 以上、好ましくは約 6 0 % 以上、より好ましくは約 7 0
% 以上、さらに好ましくは約 8 0 % 以上、なかでも好ましくは約 9 0 % 以上、最
も好ましくは約 9 5 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。具
体的には、配列番号：6 3、配列番号：6 5、配列番号：9 5、配列番号：9 7、
配列番号：7 7、配列番号：8 5、配列番号：8 7、配列番号：8 9、配列番
25 号：9 1、配列番号：9 3、配列番号：7 1、配列番号：7 5、または配列番号
：8 3 で表されるアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：1 または配列番号：3 で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一の
アミノ酸配列としては、

(1) (i) 配列番号：1 または配列番号：3 で表されるアミノ酸配列中の 1 ～ 1

35

5 個（好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、

- (ii) 配列番号：1または配列番号：3で表されるアミノ酸配列に1～15個（好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、

(iii) 配列番号：1または配列番号：3で表されるアミノ酸配列に1～15個（好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、

- (iv) 配列番号：1または配列番号：3で表されるアミノ酸配列中の1～15個（好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、および

(v) 上記(i)～(iv)を組み合わせたアミノ酸配列、および

- (2) (i) 配列番号：63または配列番号：65で表されるアミノ酸配列中の1～15個（好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、

(ii) 配列番号：63または配列番号：65で表されるアミノ酸配列に1～15個（好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、

- (iii) 配列番号：63または配列番号：65で表されるアミノ酸配列に1～15個（好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、

(iv) 配列番号：63または配列番号：65で表されるアミノ酸配列中の1～15個（好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、および

- (v) 上記(i)～(iv)を組み合わせたアミノ酸配列などがあげられる。

配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質と

36

実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.5～20倍、より好ましくは約0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度やタンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができる。

- 10 本発明のレセプターの具体例としては、(i) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質、(ii) 配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質、(iii) 配列番号：63で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質、(iv) 配列番号：65で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質、(v) 配列番号：51で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、(vi) 配列番号：55で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、(vii) 配列番号：69で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、(viii) 配列番号：95で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、(ix) 配列番号：97で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、(x) 配列番号：77で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、(xi) 配列番号：85で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、(xii) 配列番号：87で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、(xiii) 配列番号：89で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、(xiv) 配列番号：91で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、(xv) 配列番号：93で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、(xvi) 配列番号：71で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、(xvii) 配列番号：75で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、(xviii) 配列番号：83で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、(xix) 配列番号：102で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、(xx) 配列番号：104で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質などが挙げられる。

本発明のレセプターの部分ペプチド（以下、本発明の部分ペプチドと称する場合

合がある) としては、後述の医薬等のスクリーニング方法に用いることのできる部分ペプチドであれば、いかなるものであってもよく、好ましくは、本発明のポリペプチドに対する結合能を有する部分ペプチド、細胞膜外領域に相当するアミノ酸配列を含有する部分ペプチド等が用いられる。

- 5 具体的には、配列番号：1または配列番号：3で表されるアミノ酸配列中、50番目(Thr)～335番目(Ser)で表される部分アミノ酸配列から選択される1または2以上の部分アミノ酸配列を含有する部分ペプチドなどがあげられる。

- 10 本発明のポリペプチド、本発明のレセプターまたは本発明の部分ペプチドは、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端(アミノ末端)、右端がC末端(カルボキシル末端)である。本発明のポリペプチド、本発明のレセプターまたは本発明の部分ペプチドは、C末端がカルボキシル基($-\text{COOH}$)、カルボキシレート($-\text{COO}^-$)、アミド($-\text{CONH}_2$)またはエステル($-\text{COOR}$)であってもよい。

- 15 ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、 n -プロピル、イソプロピルもしくは n -ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキル基などの C_{7-14} アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

- 25 本発明のポリペプチド、本発明のレセプターまたは本発明の部分ペプチドがC末端以外にカルボキシル基(またはカルボキシレート)を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のポリペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のポリペプチド、本発明のレセプターまたは本発明の部分ペプチドには、N末端のアミノ酸残基(例、メチオニン残基)のアミノ基が保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などの C_{1-6} アルカノイルなどの C_{1-6} アシル

基など)で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基(例えば-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など)が適当な保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₋₆アルカノイル基などのC₁₋₆アシル基など)で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

本発明のポリペプチド、本発明のレセプターまたは本発明の部分ペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸(例、無機酸、有機酸)や塩基(例、アルカリ金属塩)などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩などが用いられる。

本発明のポリペプチド、本発明のレセプターまたは本発明の部分ペプチドは、公知の方法で標識化されていてもよく、具体的にはアイソトープラベル化されたもの、蛍光標識されたもの(例えば、フルオレセインなどによる蛍光標識)、ビオチン化されたもの、または酵素標識されたものなどがあげられる。

本発明のポリペプチド、本発明のレセプターまたは本発明の部分ペプチドは、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から公知のポリペプチドの精製方法によって製造することもできるし、後述するポリペプチドをコードするDNAで形質転換された形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

ヒトや温血動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや温血動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせるにより精製単離することができる。

本発明のポリペプチド、本発明のレセプターまたは本発明の部分ペプチド(それらのアミド体、それらの塩も含む)の合成には、通常市販のポリペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル

樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、
4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン
樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹
脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロ
5 キシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmoc
アミノエチル)フェノキシ樹脂などをあげることができる。このような樹脂を
用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするポリ
ペプチドの配列通りに、公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応
の最後に樹脂からポリペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに
10 高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のポリペプチド
、レセプター、部分ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、ポリペプチド合成に使用できる各種
活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジ
イミド類としては、DCC、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エ
15 チル-N'- (3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる
。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBT、HOObt）
とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはH
OBTエステルあるいはHOObtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活
性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

20 保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ポリペプ
チド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば
、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチル
ピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭
化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシド
25 などのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエー
テル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢
酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反
応温度はポリペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から
適宜選択され、通常約-20℃～50℃の範囲から適宜選択される。活性化され

40

たアミノ酸誘導体は通常 1.5 ～ 4 倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、t-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、t-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級（C₁₋₆）アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl₂-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、t-ブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホンイル、DNP、ベンジルオキシメチル

41

、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチル
5 アルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素な
10 どの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-2
15 0℃～40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1, 4-ブタンジチオール、1, 2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2, 4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、ト
20 リプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1, 2-エタンジチオール、1, 4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護
25 基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

本発明のポリペプチド、本発明のレセプターまたは本発明の部分ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（ポリペプチ

42

ド) 鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたポリペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したポリペプチドとを製造し、この両ポリペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた

5 保護ポリペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ポリペプチドを得ることができる。この粗ポリペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のポリペプチド、レセプターまたは部分ペプチドのアミド体を得ることができる。

本発明のポリペプチド、本発明のレセプターまたは本発明の部分ペプチドのエ

10 ステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、ポリペプチド、レセプターまたは部分ペプチドのアミド体と同様にして、所望のポリペプチド、レセプターまたは部分ペプチドのエステル体を得ることができる。

本発明のポリペプチド、本発明のレセプターまたは本発明の部分ペプチドは、

15 公知のペプチドの合成法に従って、あるいはレセプターの部分ペプチドについては、レセプターを適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のポリペプチド、本発明のレセプターまたは本発明の部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを

20 縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の(i)～(v)に記載された方法があげられる。

(i) M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

25 (ii) SchroederおよびLuebke、ザ・ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

(iii) 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

(iv) 矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

(v) 矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明のポリペプチド、レセプターまたはその部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られるポリペプチド、レセプターまたは部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

本発明のポリペプチド、本発明のレセプターまたは本発明の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、本発明のポリペプチド、本発明のレセプターまたは本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するもの（DNAまたはRNA、好ましくはDNA）であればいかなるものであってもよい。該ポリヌクレオチドとしては、本発明のポリペプチド、本発明のレセプターまたは本発明の部分ペプチドをコードするDNA、mRNA等のRNAであり、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA：RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖（すなわち、コード鎖）であっても、アンチセンス鎖（すなわち、非コード鎖）であってもよい。DNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接RT-PCR法によって増幅することもできる。

本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、例えば

(i) 配列番号：41、配列番号：42、配列番号：43、配列番号：44、配列番号：37、配列番号：38、配列番号：39、配列番号：40、配列番号：45、配列番号：46、配列番号：47、配列番号：48または配列番号：50で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチド、

(ii) 配列番号：41、配列番号：42、配列番号：43、配列番号：44、配列番号：37、配列番号：38、配列番号：39、配列番号：40、配列番号：45、配列番号：46、配列番号：47、配列番号：48または配列番号：50で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のポリペプチドと実質的に同質の活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(iii) 配列番号：18、配列番号：27または配列番号：60で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチド、または

(iv) 配列番号：18、配列番号：27または配列番号：60で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有するポリヌクレオチドなどであれば何れのものでもよい。

配列番号：41、配列番号：42、配列番号：43、配列番号：44、配列番号：37、配列番号：38、配列番号：39、配列番号：40、配列番号：45、配列番号：46、配列番号：47、配列番号：48または配列番号：50で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるポリヌクレオチドとしては、例えば、配列番号：41、配列番号：42、配列番号：43、配列番号：44、配列番号：37、配列番号：38、配列番号：39、配列番号：40、配列番号：45、配列番号：46、配列番号：47、配列番号：48または配列番号：50で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するポリヌクレオチドなどが用いられる。

配列番号：18、配列番号：27または配列番号：60で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるポリヌクレオチドとしては、例えば、配列番号：18、配列番号：27または配列番号：60で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するポリヌクレオチドなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al.,

Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

- 5 ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約 19 ~ 40 mM、好ましくは約 19 ~ 20 mM で、温度が約 50 ~ 70 °C、好ましくは約 60 ~ 65 °C の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約 19 mM で温度が約 65 °C の場合が最も好ましい。

- 10 具体的には、(i) 配列番号：20 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号：41 で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドなどが、

(ii) 配列番号：21 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号：42 で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドなどが、

- 15 (iii) 配列番号：22 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号：43 で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドなどが、

- (iv) 配列番号：23 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号：44 で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドなどが、

- 20 (v) 配列番号：49 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号：50 で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドなどが、

- (vi) 配列番号：12 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号：37 で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドなどが、

- 25 (vii) 配列番号：13 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号：38 で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドなどが、

46

(viii) 配列番号：14で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号：39で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドなどが、

(ix) 配列番号：36で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号：40で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドなどが、

(x) 配列番号：29で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号：45で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドなどが、

(xi) 配列番号：30で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号：46で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドなどが、

(xii) 配列番号：31で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号：47で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドなどが、

(xiii) 配列番号：32で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号：48で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドなどが、

(xiv) 配列番号：19で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号：18で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドなどが、

(xv) 配列番号：28で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号：27で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドなどが、

(xvi) 配列番号：61で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号：60で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドなどが用いられる。

本発明のレセプターをコードするポリヌクレオチドとしては、例えば、配列番号：2または配列番号：4で表される塩基配列を含有するポリヌクレオチド、ま

たは配列番号：2または配列番号：4で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、本発明のレセプターと実質的に同質の活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドなどであれば何れのものでもよい。

- 5 配列番号：2または配列番号：4で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるポリヌクレオチドとしては、例えば、それぞれ配列番号：2または配列番号：4で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するポリヌクレオチドなどが用いられる。
- 10 例えば、配列番号：64、配列番号：66、配列番号：96、配列番号：98、配列番号：99、配列番号：100、配列番号：101、配列番号：52、配列番号：54、配列番号：56、配列番号：68、配列番号：70、配列番号：78、配列番号：86、配列番号：88、配列番号：90、配列番号：92、配列番号：94、配列番号：72、配列番号：76、配列番号：84、配列番号：1
- 15 03または配列番号：105で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドで表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドなどが挙げられる。

ハイブリダイゼーションは、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

20

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40 mM、好ましくは約19~20 mMで、温度が約50~70℃、好ましくは約60~65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19 mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

25

より具体的には、

(i) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号：2で表わされる塩基配列を含有するポ

48

リヌクレオチド、配列番号：54で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチド、配列番号：68で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドが、

- (ii) 配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号：4で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチド、配列番号：101で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドが、

(iii) 配列番号：63で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号：64で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドが、

- 10 (iv) 配列番号：65で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号：66で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドが、

- (v) 配列番号：95で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号：96で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチド、配列番号：99で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチド、配列番号：100で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドが、

- 15 (vi) 配列番号：97で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号：98で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドが、

(vii) 配列番号：51で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号：52で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドが、

- 20 (viii) 配列番号：55で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号：56で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドが、

25 (ix) 配列番号：69で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号：70で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドが、

49

(x) 配列番号：77で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号：78で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドが、

5 (xi) 配列番号：85で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号：86で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドが、

(xii) 配列番号：87で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号：88で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドが、

10 (xiii) 配列番号：89で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号：90で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドが、

(xiv) 配列番号：91で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号：92で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドが、

15 (xv) 配列番号：93で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号：94で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドが、

(xvi) 配列番号：71で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号：72で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドが、

(xvii) 配列番号：75で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号：76で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドが、

25 (xviii) 配列番号：83で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号：84で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドなどが、

(xix) 配列番号：102で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号：103で表わされる塩基配列を

含有するポリヌクレオチドなどが、

(xx) 配列番号：104で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号：105で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドなどが用いられる。

- 5 本発明の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、例えば、配列番号：2または配列番号：4で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドの部分塩基配列を有するポリヌクレオチド、または配列番号：2または配列番号：4で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、本発明のレセプターと実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドの部分塩基配列を有するポリヌクレオチドなどが用いられる。
- 10

配列番号：2または配列番号：4で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるポリヌクレオチドは、前記と同意義を示す。

- ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。
- 15

- また、本発明のレセプターの部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドとしてより具体的には、配列番号：1または配列番号：3で表されるアミノ酸配列中、50番目（T h r）～335番目（S e r）で表される部分アミノ酸配列から選択される1または2以上の部分アミノ酸配列を含有する部分ペプチドをコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、またはこれらとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有するポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドなどがあげられる。
- 20

- 本発明のポリペプチド、本発明のレセプターまたは本発明の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドは、公知の方法で標識化されていてもよく、具体的にはアイソトープラベル化されたもの、蛍光標識されたもの（例えば、フルオレセインなどによる蛍光標識）、ビオチン化されたものまたは酵素標識されたものなどがあげられる。
- 25

本発明のポリペプチド、本発明のレセプターまたは本発明の部分ペプチド（以下、これらポリペプチドなどをコードするDNAのクローニングおよび発現の説

51

明においては、これらポリペプチドなどを単に本発明のポリペプチドと略記する場合がある)を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のポリペプチドの部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いて公知のPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のポリペプチドの一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、Molecular Cloning 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

DNAの塩基配列の置換は、公知のキット、例えば、MutanTM-super Express Km (宝酒造(株))、MutanTM-K (宝酒造(株))等を用いて、ODA-LA PCR法、Gapped duplex法、Kunkel法等の公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化されたポリペプチドをコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のポリペプチドの発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のポリペプチドをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110、pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19、pSH15)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、p

Rc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR α プロモーター、SV40プロモーター、HIV・LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどがあ

げられる。

これらのうち、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、SR α プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ PLプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neo^rと略称する場合がある、G418耐性）等があげられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のポリペプチドのN末端側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動

物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

- 5 宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12・DH1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60巻, 160(1968)], JM103 [Nucleic Acids Research, 9巻, 309(1981)], JA221 [Journal of Molecular Biology, 120巻, 517(1978)], HB101 [Journal of Molecular Biology, 41巻, 459(1969)], C600 [Genetics, 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) MI114 [Gene, 24巻, 255(1983)], 207-21 [Journal of Biochemistry, 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) KM71 などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、ヨトウガの幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh FiveTM細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞または*Estigmene acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、カイコ由来株化細胞 (*Bombyx mori* N細胞; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L. ら、In Vivo, 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、Nature, 315巻, 592(1985)〕。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO（以下、CHO細胞と略記）, dhfr遺伝子欠損チャイニ
5 ーズハムスター細胞CHO（以下、CHO(dhfr⁻)細胞と略記）, マウスL細胞, マウスAtT-20, マウスミエローマ細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69巻, 2110(1972)やGene, 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行な
10 うことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、Molecular & General Genetics, 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、Methods in Enzymology, 194巻, 182-187(1991)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75巻, 1929(1978)などに記載の方法
15 に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、Bio/Technology, 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコール, 263-267(1995)（秀潤社発行）、Virology, 52巻, 456(1973)に記載
20 の方法に従って行なうことができる。

このようにして、ポリペプチドをコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生
25 育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグ

ネシウムなどがあげられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5～8が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller) , Journal of Experiments in

- 5 Molecular Genetics, 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

- 10 宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地〔Bostian, K. L. ら、Proc. Natl. Acad.

- 15 Sci. USA, 77巻, 4505 (1980)〕や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地〔Bitter, G. A. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81巻, 5330 (1984)〕があげられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., Nature, 195, 788 (1962)) に非動化した

- 20 10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔Science, 122巻, 501 (1952)

- 25)〕, DMEM培地〔Virology, 8巻, 396 (1959)〕, RPMI 1640培地〔The Journal of the American Medical Association, 199巻, 519 (1967)〕, 199培地〔Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73巻, 1 (1950)〕などが用いられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30℃～40℃で約15～60時間行ない、必要に応じて通

気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外などに本発明のポリペプチドを生成せしめることができる。

上記培養物から本発明のポリペプチドを分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明のポリペプチドを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりポリペプチドの粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤や、トリトンX-100TMなどの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にポリペプチドが分泌される場合には、培養終了後、公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるポリペプチドの精製は、公知の分離・精製法を適宜組み合わせで行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

かくして得られるポリペプチドが遊離体で得られた場合には、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生するポリペプチドを、精製前または精製後に適当なタンパク質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。タンパク質修飾酵素としては、例えば、トリ

プシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターに対する抗体（以下、単に本発明の抗体と称する場合がある）は、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター（その部分ペプチド、それらのアミドもしくはそれらのエステルまたはその塩を含む）に対する抗体を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。本発明のレセプターに対する抗体としては、レセプターのシグナル伝達を不活性化する抗体、レセプターのシグナル伝達を活性化する抗体などが挙げられる。

- 10 本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターに対する抗体は、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターを抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

（a）モノクローナル抗体産生細胞の作製

- 15 本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターは、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリがあげられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。
- 20

- モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化ポリペプチドと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔Nature、256、495（1975）〕に従い実施することができる
- 25

58

。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）やセンダイウィルスなどがあげられるが、好ましくはPEGが用いられる。

5 骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などの温血動物の骨髓腫細胞があげられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1：1～20：1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000～PEG6000）が10～80％程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

10 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、ポリペプチド（タンパク質）抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、
15 免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したポリペプチドを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。

モノクローナル抗体の選別は、公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添
20 加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20％、好ましくは10～20％の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10％の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。
25 培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5％炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

（b）モノクローナル抗体の精製

59

モノクローナル抗体の分離精製は、公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、D E A E）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを
5 採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（ポリペプチド抗原）自体、あるいはそれ
10 とキャリアタンパク質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行い、該免疫動物から本発明のポリペプチドに対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。

温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアタンパク質との複
15 合体に関し、キャリアタンパク質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

20 また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全
25 フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と

60

同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

5 本発明のポリペプチド、本発明のレセプターまたは本発明の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド（例、DNA）に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有するポリヌクレオチド（例、DNA）としては、該ポリヌクレオチドに相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有し、該ポリヌクレオチドの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのポリヌクレオチド（アンチセンスポリヌクレオチド）であってもよい。

10 具体的には、本発明のポリペプチド、本発明のレセプターまたは本発明の部分ペプチドをコードするDNA（以下、これらのDNAを本発明のDNAと略記する場合がある）に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有するアンチセンスDNA（以下、これらのDNAをアンチセンスDNAと略記する場合がある）が挙げられ、本発明のDNAに相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有する
15 ものであれば、いずれのアンチセンスDNAであってもよい。

本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列（すなわち、本発明のDNAの相補鎖）の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90
20 %以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などがあげられる。特に、本発明のDNAの相補鎖の全塩基配列うち、本発明のポリペプチドのN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスDNAが好
25 適である。これらのアンチセンスDNAは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

具体的には、配列番号：2、4、18、27、37～48、50、52、54～56、60、64、66、68、70、72、76、78、84、86、88～90、92、94、96、98～101、103または105で表わされる塩

61

基配列を有するDNAの塩基配列に相補的な、もしくは実質的に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチド、好ましくは例えば、配列番号：2、4、18、27、37～48、50、52、54～56、60、64、66、68、70、72、76、78、84、86、88～90、92、94、96、98～101、103または105で表わされる塩基配列を有するDNAの塩基配列に相補な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチドなどが挙げられる。

アンチセンスポリヌクレオチドは通常、10～40個程度、好ましくは15～30個程度の塩基から構成される。

10 ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、アンチセンスDNAを構成する各ヌクレオチドのりん酸残基（ホスフェート）は、例えば、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、ホスホロジチオネートなどの化学修飾りん酸残基に置換されていてもよい。これらのアンチセンスポリヌクレオチドは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

15 本発明に従えば、本発明のレセプターまたはポリペプチド遺伝子の複製または発現を阻害することのできるアンチセンスポリヌクレオチド（核酸）を、クローン化した、あるいは配列が決定されたタンパク質をコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。かかるポリヌクレオチド（核酸）は、本発明のレセプターまたはポリペプチド遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができる、該RNAの合成または機能を阻害することができるか、あるいは本発明のレセプターまたはポリペプチド関連RNAとの相互作用を介して本発明のレセプターまたはポリペプチド遺伝子の発現を調節・制御することができる。本発明のレセプターまたはポリペプチド関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、および本発明のレセプターまたはポリペプチド関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内および生体外で本発明のレセプターまたはポリペプチド遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療または診断に有用である。本発明のレセプターまたはポリペプチド遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳終止コドン、タンパク質コード領域、OR

F 翻訳終止コドン、3' 端非翻訳領域、3' 端パリンドローム領域、および3' 端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、本発明のレセプターまたはポリペプチド遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

5 目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なポリヌクレオチドとの関係、あるいは対象物とハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドとの関係は、「アンチセンス」であるといえることができる。アンチセンスポリヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格
10 を有するその他のポリマー（例えば、市販のタンパク質、核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、二本鎖DNA、一本鎖DNA、二本鎖RNA、一本鎖RNA、さらにDNA：R
15 NAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば公知の標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホ
20 スホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えばタンパク質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リジンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレート化合物（例
25 えば、アクリジン、ソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 α アノマー型の核酸など）であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他

の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチド（核酸）は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸（RNA、DNA）である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。

こうした修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp. 247, 1992; Vol. 8, pp. 395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに開示がある。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リポゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピド、コレステロールなど）といった疎水性のものが挙げられる。付加するのに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3'端あるいは5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結

64

合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3'端あるいは5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNAseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいは本発明のタンパク質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸は公知の各種の方法で細胞に適用できる。

10 以下に、(i) 本発明のポリペプチドおよび本発明のレセプター、(ii) 本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターをコードするポリヌクレオチド（本発明のポリヌクレオチド）、(iii) 本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターに対する抗体（本発明の抗体）および(iv) 本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターのアンチセンスポリヌクレオチド（例、本発明のアンチセンスDNA）などの用途を説明する。

15 (1) 本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターが関与する各種疾病の予防・治療剤

本発明のポリペプチドは、本発明のレセプターへの結合活性、本発明のレセプター発現細胞の細胞刺激活性（例、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cAMP生成抑制、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、GTP γ S結合活性、cAMP依存性プロテインキナーゼの活性化、cGMP依存性プロテインキナーゼの活性化、リン脂質依存性プロテインキナーゼの活性化、または微小管結合タンパク質リン酸化酵素（MAPキナーゼ）の活性化などを促進する活性など）を有し、本発明のレセプターの内因性リガンドである。

本発明のレセプターが本発明のポリペプチドに応答すると、摂食行動が抑制され、腫瘍が増殖する。

従って本発明のポリペプチド、本発明のレセプターまたは本発明のポリヌクレ

オチド（例、DNA）に異常があったり、欠損している場合、または本発明のレセプターまたは該レセプターをコードするDNAに異常があったり、欠損している場合には、例えば、肥満症（例、悪性肥満細胞症、外因性肥満、過インシュリン性肥満症、過血漿性肥満、下垂体性肥満、減血漿性肥満症、甲状腺機能低下肥

5 満症、視床下部性肥満、症候性肥満症、小児肥満、上半身肥満、食事性肥満症、性機能低下性肥満、全身性肥満細胞症、単純性肥満、中心性肥満など）、摂食亢進症となる可能性が高い。従って、本発明のポリペプチド、本発明のレセプターまたは本発明のポリヌクレオチド（例、DNA）は、例えば、肥満症、摂食亢進症などの予防・治療剤などの低毒性で安全な医薬として使用することができる。

- 10 さらに、本発明のポリペプチド、本発明のレセプターまたは本発明のポリヌクレオチドに異常があったり、欠損している場合には、例えば、中枢疾患（例、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害など）、内分泌疾患（例、高血圧症、性腺機能異常、甲状腺機能異常、下垂体機能異常など）、代謝疾患（例、糖尿病、脂質代謝異常、高脂血症など）などの種々の疾病が発症する可能性もある。よって、本
- 15 発明のポリペプチド、本発明のレセプターまたは本発明のポリヌクレオチドは、例えば、これら種々の疾病の予防・治療剤などの医薬として使用することもできる。中でも、好ましくは、肥満症の予防・治療剤である。

- 本発明のポリペプチド、本発明のレセプターまたは本発明のポリヌクレオチドは、例えば、生体内において本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターが
- 20 減少あるいは欠損している患者がいる場合に、（イ）本発明のポリヌクレオチドを該患者に投与し、生体内で本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターを発現させることによって、（ロ）細胞に本発明のポリヌクレオチドを挿入し、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターを発現させた後に、該細胞を患者に移植することによって、または（ハ）本発明のポリペプチドまたは本発明のレ
- 25 セプターを該患者に投与することなどによって、該患者における本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの役割を十分に、あるいは正常に発揮させることができる。

本発明のポリヌクレオチドを上記の予防・治療剤として使用する場合は、該ポリヌクレオチドを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクタ

66

一、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは温血動物に投与することができる。本発明のポリヌクレオチドは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターを上記の予防・治療剤として使用する場合は、少なくとも90%、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上に精製されたものを使用するのが好ましい。

- 10 本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターは、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、または水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターを生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

- 20 錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を

67

含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノールなど）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート 80TM、HCO-50 など）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。

本発明のポリヌクレオチド（例、DNA）が挿入されたベクターも上記と同様に製剤化され、通常、非経口的に使用される。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、など）に対して投与することができる。

本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、肥満症の治療目的で本発明のポリペプチドを経口投与する場合、一般的に成人（60 kg として）においては、一日につき該ポリペプチドを約 0.1 mg ~ 100 mg、好ましくは約 1.0 ~ 50 mg、より好ましくは約 1.0 ~ 20 mg 投与する。非経口的に投与する場合は、該ポリペプチドまたは該レセプターの 1 回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、肥満症の治療目的で本発明のポリペプチドを注射剤の形で成人（体重 60 kg として）に投与する場合、一日につき該ポリペプチドまたは該レセプターを約 0.01 ~ 30 mg 程度、好ましくは約 0.1 ~ 20 mg 程度、より好ましくは約 0.1 ~ 10 mg 程度を患部に注射することにより投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当たりに換算した量を投与することができる。

本発明のレセプター A は、本発明のレセプターと共発現することにより、ドミ

68

ナントネガティブ作用を示す。従って、本発明のレセプターAまたは本発明のレセプターAをコードするポリヌクレオチドは、癌（例、大腸癌、結腸癌、直腸癌、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、子宮頸部癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、

- 5 脳腫瘍、血液腫瘍など）の予防・治療剤、アポトーシス誘導剤などの低毒性で安全な医薬としても使用することができる。本発明のレセプターAまたは本発明のレセプターAをコードするポリヌクレオチドの製剤化、投与方法または投与量などは上記に準じる。

（2）疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

- 10 本発明のポリペプチドは、本発明のレセプターへの結合活性、本発明のレセプター発現細胞の細胞刺激活性を有し、本発明のレセプターの内因性リガンドである。本発明のレセプターが本発明のポリペプチドに応答すると、摂食行動が抑制され、腫瘍が増殖する。

- 15 これより、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの活性または機能を促進する化合物またはその塩は、例えば、肥満症（例、悪性肥満細胞症、外因性肥満、過インシュリン性肥満症、過血漿性肥満、下垂体性肥満、減血漿性肥満症、甲状腺機能低下肥満症、視床下部性肥満、症候性肥満症、小児肥満、上半身肥満、食事性肥満症、性機能低下性肥満、全身性肥満細胞症、単純性肥満、中心性肥満など）、摂食亢進症などの安全で低毒性な予防・治療剤などの医薬として
- 20 使用できる。あるいは、中枢疾患（例、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害など）、内分泌疾患（例、高血圧症、性腺機能異常、甲状腺機能異常、下垂体機能異常など）、代謝疾患（例、糖尿病、脂質代謝異常、高脂血症など）などの安全で低毒性な予防・治療剤などの医薬としても使用できる。中でも、好ましくは、肥満症の予防・治療剤である。

- 25 一方、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの活性または機能を阻害する化合物またはその塩は、例えば、癌（例、大腸癌、結腸癌、直腸癌、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、子宮頸部癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）の予防・治療剤、摂食（食欲）促進剤、拒食症の予防・治療剤

、アポトーシス誘導剤などの低毒性で安全な医薬として有用である。あるいは、中枢疾患（例、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害など）、内分泌疾患（例、高血圧症、性腺機能異常、甲状腺機能異常、下垂体機能異常など）、代謝疾患（例、糖尿病、脂質代謝異常、高脂血症など）などの安全で低毒性な予防・治療剤などの医薬として有用である。中でも好ましくは、癌の予防・治療剤、アポトーシス誘導剤、摂食促進剤などである。

該スクリーニングは、本発明のポリペプチドを用いるか、または組換え型本発明のポリペプチドの発現系、あるいは本発明のレセプターを用いるか、または組換え型本発明のレセプターの発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物（例、本発明のポリペプチドとレセプターとの結合性を変化させる化合物など）またはその塩（例、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）をスクリーニングすることができる。このような化合物には、本発明のレセプターを介して細胞刺激活性（例、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cAMP 生成抑制、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下、GTP γ S 結合活性、cAMP 依存性プロテインキナーゼの活性化、cGMP 依存性プロテインキナーゼの活性化、リン脂質依存性プロテインキナーゼの活性化、または微小管結合タンパク質リン酸化酵素（MAP キナーゼ）の活性化などを促進する活性などを有する化合物（アゴニスト）、該細胞刺激活性を有しない化合物（アンタゴニスト）、本発明のポリペプチドとレセプターとの結合力を増強する化合物、または本発明のポリペプチドとレセプターとの結合力を減少させる化合物などが含まれる。

本発明は、本発明のポリペプチドを用いることを特徴とする本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

具体的には、(i) 本発明のレセプターまたは本発明の部分ペプチド（以下、これらを単に本発明のレセプターと略称する場合がある）に、本発明のポリペ

チドを接触させた場合と (ii) 本発明のレセプターに、本発明のポリペプチドおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物（本発明のポリペプチドと本発明のレセプターの結合性を変化させる化合物）またはその塩のスクリーニング方法を

5 提供する。

本発明のスクリーニング方法においては、(i) 本発明のレセプターに、本発明のポリペプチドを接触させた場合と (ii) 本発明のレセプターに、本発明のポリペプチドおよび試験化合物を接触させた場合における、例えば該本発明のレセプターに対する本発明のポリペプチドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、

10 比較する。

本発明のスクリーニング方法の具体例としては、

① (i) 本発明のポリペプチド（好ましくは標識した本発明のポリペプチド）を、本発明のレセプターに接触させた場合と、(ii) 本発明のポリペプチド（好ましくは標識した本発明のポリペプチド）および試験化合物を、本発明のレセプターに接触させた場合における、本発明のポリペプチド（好ましくは標識した本発明のポリペプチド）の本発明のレセプターに対する結合量を測定し、比較する本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物（本発明のポリペプチドと本発明のレセプターとの結合性を変化させる化合物）またはその塩のスクリーニング方法が挙げられ、好ましくは、

15

② (i) 本発明のポリペプチド（好ましくは標識した本発明のポリペプチド）を、本発明のレセプターを含有する細胞（好ましくは本発明のレセプターをコードするポリヌクレオチドを含有する形質転換体）または該細胞の膜画分に接触させた場合と、(ii) 本発明のポリペプチド（好ましくは標識した本発明のポリペプチド）および試験化合物を、本発明のレセプターを含有する細胞（好ましくは本発明のレセプターをコードするポリヌクレオチドを含有する形質転換体）または該細胞の膜画分に接触させた場合における、本発明のポリペプチド（好ましくは標識した本発明のポリペプチド）の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較する本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物（本発明のポリペプチドと本発明のレセプターとの結合性を変化させる化合物）またはそ

20

25

の塩のスクリーニング方法、

③ (i) 本発明のポリペプチド（好ましくは標識した本発明のポリペプチド）を、本発明のレセプターをコードするポリヌクレオチドを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプターに接触させた場合と、
5 (ii) 本発明のポリペプチド（好ましくは標識した本発明のポリペプチド）および試験化合物を、本発明のレセプターをコードするポリヌクレオチドを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプターに接触させた場合における、本発明のポリペプチド（好ましくは標識した本発明のポリペプチド）の本発明のレセプターに対する結合量を測定し、比較する本発明
10 のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物（本発明のポリペプチドと本発明のレセプターとの結合性を変化させる化合物）またはその塩のスクリーニング方法、

④ (i) 本発明のレセプターを活性化する物質（例えば、本発明のポリペプチド）を、本発明のレセプターを含有する細胞に接触させた場合と、 (ii) 本発明の
15 レセプターを活性化する物質および試験化合物を、本発明のレセプターを含有する細胞に接触させた場合における、本発明のレセプターを介した細胞刺激活性（例、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cAMP 生成抑制、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下、GTPγS 結合活性、cAMP 依存性プロテインキナーゼの活性化、
20 cGMP 依存性プロテインキナーゼの活性化、リン脂質依存性プロテインキナーゼの活性化、または微小管結合タンパク質リン酸化酵素（MAPキナーゼ）の活性化などを促進する活性など）を測定し、比較する本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物（本発明のポリペプチドと本発明のレセプターとの
25 結合性を変化させる化合物）またはその塩のスクリーニング方法、および

⑤ (i) 本発明のレセプターを活性化する物質（例えば、本発明のポリペプチドなど）を、本発明のレセプターをコードするポリヌクレオチドを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプターに接触させた場合と、 (ii) 本発明のレセプターを活性化する物質および試験化合物を、本

発明のレセプターをコードするポリヌクレオチドを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプターに接触させた場合における、本発明のレセプターを介する細胞刺激活性（例、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cAMP 生成

- 5 抑制、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下、GTPγS 結合活性、cAMP 依存性プロテインキナーゼの活性化、cGMP 依存性プロテインキナーゼの活性化、リン脂質依存性プロテインキナーゼの活性化、または微小管結合タンパク質リン酸化酵素（MAP キナーゼ）の活性化などを促進する活性など）
- 10 を測定し、比較する本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物（本発明のポリペプチドと本発明のレセプターとの結合性を変化させる化合物）またはその塩のスクリーニング方法などが挙げられる。

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

- 15 まず、本発明のスクリーニング方法に用いる本発明のレセプターとしては、本発明のポリペプチドをリガンドとして認識するものであれば何れのものであってもよく、ヒトや温血動物の臓器の膜画分などが好適である。しかしながら、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させた本発明のレセプターなどが適している。

- 20 本発明のスクリーニング方法において、本発明のレセプターを含有する細胞または該細胞膜画分などを用いる場合、後述の調製法に従えばよい。

本発明のレセプターを含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法は公知の方法に従って行うことができる。

- 25 本発明のレセプターを含有する細胞としては、本発明のレセプターを発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、前述の大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。また、本発明のレセプターを発現した宿主細胞は、前述の本発明のポリペプチドを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体の製造方法と同様の方法などがあげられる。

膜画分としては、細胞を破碎した後、公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン（Kinematica社製）による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などがあげられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500rpm～3000rpm）で短時間（通常、約1分～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000rpm～30000rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現した本発明のレセプターと細胞由来のリン脂質や膜タンパク質などの膜成分が多く含まれる。

本発明のレセプターを含有する細胞や膜画分中の本発明のレセプターの量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

前記①～③のスクリーニング方法を実施するためには、適当な本発明のレセプター画分と、標識した本発明のポリペプチドなどが用いられる。本発明のレセプター画分としては、天然型の本発明のレセプター画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型本発明のレセプター画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性などを示す。標識した本発明のポリペプチドとしては、標識した本発明のポリペプチド、標識した本発明のポリペプチドアナログ化合物などが用いられる。

標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリホスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートな

74

どが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。

例えば放射性同位元素で標識された本発明のポリペプチドなどが好ましく利用することができる。このうち好ましくは、 $[^{125}\text{I}]$ で標識された本発明のポリペ
5 プチドである。さらに好ましくは、 $[^{125}\text{I}]$ で標識された配列番号：62で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドなどが用いられる。

具体的には、まず本発明のレセプターを含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH4~10（望ましくはpH6~8）のリン酸バッ
10 フー、トリス塩酸バッファーなどのポリペプチドとレセプターとの結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM（花王アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによる本発明のレセプターや本発明のポリペプチドの分解を抑え
15 る目的で、PMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加してもよい。0.01ml~10mlの該レセプター溶液に、一定量（5000cpm~500000cpm）の標識した本発明のポリペプチドを添加し、同時に 10^{-10} ~ 10^{-7} Mの試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識の本発明のポリ
20 ペプチドを加えた反応チューブも用意する。反応は0℃から50℃、望ましくは4℃から37℃で20分から24時間、望ましくは30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはγ-カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント（ B_0 ）から非特異的結合量
25 （NSB）を引いたカウント（ $B_0 - \text{NSB}$ ）を100%とした時、特異的結合量（ $B - \text{NSB}$ ）が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

前記④~⑤のスクリーニング方法を実施するためには、本発明のレセプターを介する細胞刺激活性（例、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca

$^{2+}$ 遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cAMP 生成抑制、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下、GTP γ S 結合活性、cAMP 依存性プロテインキナーゼの活性化、cGMP 依存性プロテインキナーゼの活性化、リン脂質依存性プロテインキナーゼの活性化、または微小管結合タンパク質リン酸化酵素（MAP キナーゼ）の活性化などを促進する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットなどを用いて測定する。

具体的には、まず、本発明のレセプターを含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行うにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP 生成抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する生成抑制作用として検出することができる。

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当な本発明のレセプターを発現した細胞を用いるのが好ましい。本発明のレセプターを発現した細胞としては、前述の本発明のレセプター発現細胞株などが望ましい。

試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などがあげられる。

本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物（本発明のポリペプチドと本発明のレセプターとの結合性を変化させる化合物）またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明のレセプター（本発明のレセプターの部分ペプチドも含む）、本発明のレセプターを含有する細胞または本発明のレセプターを含有する細胞の膜画分、および本発明のポリペプチドを含有するものである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

76

1. スクリーニング用試薬

(i) 測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

- 5 孔径 0.45 μm のフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

(ii) 本発明のレセプター標品

本発明のレセプターを発現させたCHO細胞を、12穴プレートに 5×10^5 個/穴で継代し、37℃、5% CO_2 、95% air で2日間培養したもの。

- 10 (iii) 本発明のポリペプチド

$[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などて標識した本発明のポリペプチドを適当な溶媒または緩衝液に溶解したものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 μM に希釈する。

(iv) 本発明のポリペプチド標準液

- 15 本発明のポリペプチドを0.1%ウシ血清アルブミン (シグマ社製) を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

2. 測定法

- (i) 12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のレセプターを発現させた細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490 μl の測定用緩衝液を各
20 穴に加える。

(ii) $10^{-3} \sim 10^{-10}\text{M}$ の試験化合物溶液を5 μl 加えた後、標識した本発明のペプチドを5 μl 加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るために試験化合物の代わりに 10^{-3}M の本発明のポリペプチドを5 μl 加えておく。

- 25 (iii) 反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識された本発明のポリペプチドを0.2N NaOH-1% SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA (和光純薬製) と混合する。

(iv) 液体シンチレーションカウンター (ベックマン社製) を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次式で求める。

$$\text{PMB} = [(B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB})] \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

5 B₀ : 最大結合量

上記本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物（本発明のポリペプチドと本発明のレセプターとの結合を変化させる化合物）（結合を阻害または促進する化合物）であり、具体的には、本発明のレセプターを介して細胞刺激活性を有する化合物またはその塩（いわゆる本発明のレセプターアゴニスト）、または該刺激活性を有しない化合物（いわゆる本発明のレセプターアンタゴニスト）である。該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

上記本発明のレセプターアゴニストであるかレセプターアンタゴニストであるかの具体的な評価方法は以下の（a）または（b）に従えばよい。

（i）前記①～③のスクリーニング方法で示されるバインディング・アッセイを行い、本発明のポリペプチドと本発明のレセプターとの結合性を変化させる（特に、結合を阻害する）化合物を得た後、該化合物が上記した本発明のレセプターを介する細胞刺激活性を有しているか否かを測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩は本発明のレセプターアゴニストであり、該活性を有しない化合物またはその塩は本発明のレセプターアンタゴニストである。

（ii）（a）試験化合物を本発明のレセプターを含有する細胞に接触させ、本発明のレセプターを介した細胞刺激活性を測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩は本発明のレセプターアゴニストである。

（b）本発明のレセプターを活性化する化合物（例えば、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターアゴニストなど）を本発明のレセプターを含有する細胞に接触させた場合と、本発明のレセプターを活性化する化合物および試験化合物

を本発明のレセプターを含有する細胞に接触させた場合における、本発明のレセプターを介した細胞刺激活性を測定し、比較する。本発明のレセプターを活性化
する化合物による細胞刺激活性を減少させ得る化合物またはその塩は本発明のレセプターアンタゴニストである。

- 5 本発明のレセプターアゴニストは、本発明のレセプターに対する本発明のポリペプチドが有する生理活性と同様の作用を有しているので、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターと同様に、例えば、肥満症（例、悪性肥満細胞症、
10 外因性肥満、過インシュリン性肥満症、過血漿性肥満、下垂体性肥満、減血漿性肥満症、甲状腺機能低下肥満症、視床下部性肥満、症候性肥満症、小児肥満、上半身肥満、食事性肥満症、性機能低下性肥満、全身性肥満細胞症、単純性肥満、
中心性肥満など）、摂食亢進症などの安全で低毒性な予防・治療剤などの医薬として使用できる。あるいは、中枢疾患（例、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害
15 など）、内分泌疾患（例、高血圧症、性腺機能異常、甲状腺機能異常、下垂体機能異常など）、代謝疾患（例、糖尿病、脂質代謝異常、高脂血症など）などの安全で低毒性な予防・治療剤などの医薬としても使用できる。好ましくは、肥満症の予防・治療剤である。

- 本発明のレセプターアンタゴニストは、本発明のレセプターに対する本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターが有する生理活性を抑制することができるので、例えば、癌（例、大腸癌、結腸癌、直腸癌、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌
20 、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、子宮頸部癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）の予防・治療剤、摂食（食欲）促進剤、拒食症の予防・治療剤、アポトーシス誘導剤などの低毒性で安全な医薬として有用である。あるいは、中枢疾患（例、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害など）、内分泌疾患（例、高血圧症、性腺機能異常
25 、甲状腺機能異常、下垂体機能異常など）、代謝疾患（例、糖尿病、脂質代謝異常、高脂血症など）などの安全で低毒性な予防・治療剤などの医薬として有用である。好ましくは、癌の予防・治療剤、アポトーシス誘導剤、摂食促進剤などである。

また、本発明は、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターをコードす

る本発明のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法なども提供する。

- 5 具体的には、(i) 本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターを産生する能力を有する細胞を培養した場合と (ii) 本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターを産生する能力を有する細胞と試験化合物の混合物を培養した場合との比較を行い、本発明のポリペプチドの遺伝子または本発明のレセプターの遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする。

- 10 上記スクリーニング方法においては、例えば、(i) と (ii) の場合における、本発明のポリペプチドの遺伝子または本発明のレセプターの遺伝子の発現量（具体的には、本発明のポリペプチド量、本発明のレセプター量、本発明のポリペプチドをコードするmRNA量または本発明のレセプターをコードするmRNA量など）を測定して、比較する。

- 15 試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

- 20 上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明ポリペプチドまたは本発明のレセプターを産生する能力を有する細胞をスクリーニングに適したバッファーに浮遊して調製する。バッファーには、pH約4～10（望ましくは、pH約6～8）のリン酸バッファー、ほう酸バッファーなどの、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの活性を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。

- 25 本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターを産生する能力を有する細胞としては、例えば、前述した本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターをコードするDNAを含有するベクターで形質転換された宿主（形質転換体）などが用いられる。宿主としては、例えば、CHO細胞などの動物細胞が好ましく用いられる。該スクリーニングには、例えば、前述の方法で培養することによって、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターを細胞膜上に発現させた形質

転換体などが好ましく用いられる。

本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターのタンパク質量の測定は、公知の方法、例えば、本発明の抗体を用いて、細胞抽出液中などに存在する前記ポリペプチドまたはレセプターを、ウェスタン解析、ELISA法などの方法またはそれに準じる方法に従い測定することができる。

本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの遺伝子の発現量は、公知の方法、例えば、ノーザンブロッティングやReverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)、リアルタイムPCR解析システム (ABI社製、TaqMan polymerase chain reaction) などの方法あるいはそれに準じる方法にしたがって測定することができる。

例えば、上記(ii)の場合における本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの遺伝子の発現を、上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上促進する試験化合物を本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの遺伝子の発現を促進する化合物またはその塩として選択することができる。

例えば、上記(ii)の場合における本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの遺伝子の発現を、上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害する試験化合物を本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩として選択することができる。

本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの遺伝子の発現を促進(発現量を増加)する化合物またはその塩は、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターと同様に、例えば、肥満症(例、悪性肥満細胞症、外因性肥満、過インシュリン性肥満症、過血漿性肥満、下垂体性肥満、減血漿性肥満症、甲状腺機能低下肥満症、視床下部性肥満、症候性肥満症、小児肥満、上半身肥満、食事性肥満症、性機能低下性肥満、全身性肥満細胞症、単純性肥満、中心性肥満など)、摂食亢進症などの安全で低毒性な予防・治療剤などの医薬として使用できる。あるいは、中枢疾患(例、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害など)、内分泌疾患(例、高血圧症、性腺機能異常、甲状腺機能異常、下垂体機能異常など)、代謝

疾患（例、糖尿病、脂質代謝異常、高脂血症など）などの安全で低毒性な予防・治療剤などの医薬としても使用できる。中でも好ましくは、肥満症の予防・治療剤である。

5 本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩は、本発明のレセプターに対する本発明のポリペプチドが有する生理活性を抑制することができるので、例えば、癌（例、大腸癌、結腸癌、直腸癌、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、子宮頸部癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）の予防・治療剤、摂食（食欲）促進剤、拒食症の予防・治療剤、アポトーシス誘導剤などの低毒性で安全な医薬として有用である。

10 あるいは、中枢疾患（例、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害など）、内分泌疾患（例、高血圧症、性腺機能異常、甲状腺機能異常、下垂体機能異常など）、代謝疾患（例、糖尿病、脂質代謝異常、高脂血症など）などの安全で低毒性な予防・治療剤などの医薬として有用である。好ましくは、癌の予防・治療剤、アポトーシス誘導剤、摂食促進剤などである。

15

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物であり、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの

20 活性または機能を促進または阻害する化合物、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの遺伝子の発現を促進または阻害（発現量を増加または減少）する化合物である。

該化合物の塩としては、前記した本発明のポリペプチドの塩と同様のものが用いられる。

25 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物を上記の医薬として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、前記した本発明のポリペプチドを含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

上記化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、肥満症の治療の目的で本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの活性または機能を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kg当たり）においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、肥満症の治療の目的で本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの活性または機能を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（60kg当たり）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。

15 他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

例えば、癌の治療の目的で本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの活性または機能を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kg当たり）においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、癌の治療の目的で本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの活性または機能を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（60kg当たり）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

25

例えば、肥満症の治療の目的で本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの遺伝子の発現を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kg当たり）においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ま

しくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、肥満症の治療の目的で本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの遺伝子の発現を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（60kg当たり）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

例えば、癌の治療の目的で本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの遺伝子の発現を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kg当たり）においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、癌の治療の目的で本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの遺伝子の発現を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（60kg当たり）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

（3）本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの定量

本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターに対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）は、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターを特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

すなわち、本発明は、

（i）本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターとを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの割合を測定することを特徴とする

被検液中の本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの定量法、および

(ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの定量法を提供する。

上記 (ii) の定量法においては、一方の抗体が本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターのN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターのC端部に反応する抗体であることが望ましい。

また、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターに対するモノクローナル抗体を用いて本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの定量を行うことができるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(a b')₂、F a b'、あるいはF a b画分を用いてもよい。

本発明の抗体を用いる本発明のポリペプチドの定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、ポリペプチド量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、[¹²⁵I]、[¹³¹I]、[³H]、[¹⁴C]などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、β-ガラクトシダーゼ、β-グルコシダーゼ、アルカリホスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いる

こともできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常ポリペプチドあるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの
5 不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等があげられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（１次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（２次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより
10 被検液中の本発明のポリペプチド量または本発明のレセプター量を定量することができる。１次反応と２次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも１種類である必要は
15 なく、測定感度を向上させる等の目的で２種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの測定法においては、１次反応と２次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの結合する部位が相
20 異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、１次反応および２次反応に用いられる抗体は、例えば、２次反応で用いられる抗体が、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターのＣ端部を認識する場合、１次反応で用いられる抗体は、好ましくはＣ端部以外、例えばＮ端部を認識する抗体が用いられる。

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、
25 競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原（Ｆ）と、抗体と結合した標識抗原（Ｂ）とを分離し（Ｂ／Ｆ分離）、Ｂ、Ｆいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する

。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

5 イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

10 また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常
15 の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）、
20 入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和53年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第2版）（医学書院、昭和57年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第3版）（医学書院、昭和62年発行）、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Part A))、同書 Vol. 73 (Immunochemical
25 Techniques (Part B))、同書 Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C))、同書 Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D : Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part E : Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121 (Immunochemical
Techniques (Part I : Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以

上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。

以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターを感度良く定量することができる。

さらには、本発明の抗体を用いて本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの濃度を定量することによって、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの濃度の増加が検出された場合、例えば、癌（例、大腸癌、結腸癌、直腸癌、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、子宮頸部癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）、拒食症などの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。あるいは、中枢疾患（例、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害など）、内分泌疾患（例、高血圧症、性腺機能異常、甲状腺機能異常、下垂体機能異常など）、代謝疾患（例、糖尿病、脂質代謝異常、高脂血症など）などの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの濃度の減少が検出された場合には、例えば、肥満症（例、悪性肥満細胞症、外因性肥満、過インシュリン性肥満症、過血漿性肥満、下垂体性肥満、減血漿性肥満症、甲状腺機能低下肥満症、視床下部性肥満、症候性肥満症、小児肥満、上半身肥満、食事性肥満症、性機能低下性肥満、全身性肥満細胞症、単純性肥満、中心性肥満など）、摂食亢進症などの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。あるいは、中枢疾患（例、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害など）、内分泌疾患（例、高血圧症、性腺機能異常、甲状腺機能異常、下垂体機能異常など）、代謝疾患（例、糖尿病、脂質代謝異常、高脂血症など）などの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターを検出するために使用することができる。また、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターを精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの検出、被検細胞内における本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプ

ターの挙動の分析などのために使用することができる。

(4) 遺伝子診断薬

本発明のポリヌクレオチド（DNA）は、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトや温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、など）における本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断薬として有用である。

10 本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（Genomics, 第5巻, 874～879頁（1989年）、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 第86巻, 2766～2770頁（1989年））などにより実施することができる。

15 例えば、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの遺伝子の発現過多が検出された場合は、例えば、癌（例、大腸癌、結腸癌、直腸癌、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、子宮頸部癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）、拒食症などの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。あるいは、中枢疾患（例、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害など）、内分泌疾患（例、高血圧症、性腺機能異常、甲状腺機能異常、下垂体機能異常など）、代謝疾患（例、糖尿病、脂質代謝異常、高脂血症など）などの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

25 また、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの遺伝子の発現減少が検出された場合は、例えば、肥満症（例、悪性肥満細胞症、外因性肥満、過インシュリン性肥満症、過血漿性肥満、下垂体性肥満、減血漿性肥満症、甲状腺機能低下肥満症、視床下部性肥満、症候性肥満症、小児肥満、上半身肥満、食事性肥満症、性機能低下性肥満、全身性肥満細胞症、単純性肥満、中心性肥満など）、摂食亢進症などの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断すること

ができる。あるいは、中枢疾患（例、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害など）、内分泌疾患（例、高血圧症、性腺機能異常、甲状腺機能異常、下垂体機能異常など）、代謝疾患（例、糖尿病、脂質代謝異常、高脂血症など）などの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

5 (5) アンチセンスポリヌクレオチドを含有する医薬

本発明のポリヌクレオチド（例、DNA）に相補的に結合し、該ポリヌクレオチド（例、DNA）の発現を抑制することができるアンチセンスポリヌクレオチド（例、アンチセンスDNA）は、癌細胞のアポトーシス誘導作用などを有し、例えば、癌（例、大腸癌、結腸癌、直腸癌、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、子宮頸部癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）の予防・治療剤、摂食（食欲）促進剤、拒食症の予防・治療剤、アポトーシス誘導剤などの低毒性で安全な医薬として有用である。あるいは、中枢疾患（例、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害など）、内分泌疾患（例、高血圧症、性腺機能異常、甲状腺機能異常、下垂体機能異常など）、代謝疾患（例、糖尿病、脂質代謝異常、高脂血症など）などの安全で低毒性な予防・治療剤などの医薬として有用である。中でも好ましくは、癌の予防・治療剤、アポトーシス誘導剤、摂食促進剤などである。

10

15

例えば、上記アンチセンスDNAを用いる場合、該アンチセンスDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。該アンチセンスDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

20

さらに、該アンチセンスDNAは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

25

上記アンチセンスポリヌクレオチドと同様に、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターをコードするRNAの一部を含有する二重鎖RNA、本発明の

ポリペプチドまたは本発明のレセプターをコードするRNAの一部を含有するリボザイムなども、本発明のポリヌクレオチドの発現を抑制することができ、生体内における本発明のポリペプチド、本発明のレセプターまたは本発明のポリヌクレオチドの機能を抑制することができるので、例えば、癌（例、大腸癌、結腸癌、直腸癌、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎臓癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、子宮頸部癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）の予防・治療剤、摂食（食欲）促進剤、拒食症の予防・治療剤、アポトーシス誘導剤などの低毒性で安全な医薬として有用である。あるいは、中枢疾患（例、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害など）、内分泌疾患（例、高血圧症、性腺機能異常、甲状腺機能異常、下垂体機能異常など）、代謝疾患（例、糖尿病、脂質代謝異常、高脂血症など）などの安全で低毒性な予防・治療剤などの医薬として有用である。中でも好ましくは、癌の予防・治療剤、アポトーシス誘導剤、摂食促進剤などである。

二重鎖RNAは、公知の方法（例、Nature, 411巻, 494頁, 2001年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。

リボザイムは、公知の方法（例、TRENDS in Molecular Medicine, 7巻, 221頁, 2001年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。例えば、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターをコードするRNAの一部に公知のリボザイムを連結することによって製造することができる。本発明の本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターをコードするRNAの一部としては、公知のリボザイムによって切断され得る本発明のRNA上の切断部位に近接した部分（RNA断片）が挙げられる。

上記の二重鎖RNAまたはリボザイムを上記予防・治療剤として使用する場合、アンチセンスポリヌクレオチドと同様にして製剤化し、投与することができる。

（6）本発明の抗体を含有する医薬

本発明のポリペプチドの抗体は、例えば、癌（例、大腸癌、結腸癌、直腸癌、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎臓癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、子宮頸部癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳

腫瘍、血液腫瘍など）の予防・治療剤、摂食（食欲）促進剤、拒食症の予防・治療剤、アポトーシス誘導剤などの低毒性で安全な医薬として有用である。あるいは、中枢疾患（例、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害など）、内分泌疾患（例、高血圧症、性腺機能異常、甲状腺機能異常、下垂体機能異常など）、代謝疾患（例、糖尿病、脂質代謝異常、高脂血症など）などの安全で低毒性な予防・治療剤などの医薬として有用である。中でも好ましくは、癌の予防・治療剤、アポトーシス誘導剤、摂食促進剤などである。

本発明のレセプターを中和する作用を有する（シグナル伝達を不活性化する）本発明の抗体は、例えば、癌（例、大腸癌、結腸癌、直腸癌、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、子宮頸部癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）の予防・治療剤、摂食（食欲）促進剤、拒食症の予防・治療剤、アポトーシス誘導剤などの低毒性で安全な医薬として有用である。あるいは、中枢疾患（例、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害など）、内分泌疾患（例、高血圧症、性腺機能異常、甲状腺機能異常、下垂体機能異常など）、代謝疾患（例、糖尿病、脂質代謝異常、高脂血症など）などの安全で低毒性な予防・治療剤などの医薬として有用である。中でも好ましくは、癌の予防・治療剤、アポトーシス誘導剤、摂食促進剤などである。

本発明のレセプターのシグナル伝達を活性化する本発明の抗体は、例えば、肥満症（例、悪性肥満細胞症、外因性肥満、過インシュリン性肥満症、過血漿性肥満、下垂体性肥満、減血漿性肥満症、甲状腺機能低下肥満症、視床下部性肥満、症候性肥満症、小児肥満、上半身肥満、食事性肥満症、性機能低下性肥満、全身性肥満細胞症、単純性肥満、中心性肥満など）、摂食亢進症などの安全で低毒性な予防・治療剤などの医薬として使用できる。好ましくは、肥満症の予防・治療剤である。

本発明の抗体を含有する上記医薬は、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトや温血動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なる

が、例えば、成人の癌の患者の治療・予防のために使用する場合には、本発明の抗体（例、本発明のポリペプチドの抗体）を1回量として、通常0.01～20 mg/kg体重程度、好ましくは0.1～10 mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1～5 mg/kg体重程度を、1日1～5回程度、好ましくは1日1～3回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記またはその塩と薬理的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

すなわち、例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート80、HCO-50（polyoxyethylene（50mol）adduct of hydrogenated castor oil）〕などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールな

どを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常5～500mg、とりわけ注射剤では5～100mg、その他の剤形では10～250mgの上記抗体が含有されていることが好ましい。

10 なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

（7）DNA導入動物

本発明は、外来性の本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターをコードするDNA（以下、本発明の外来性DNAと略記する）またはその変異DNA（
15 本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- （1）本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、
- （2）非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である上記（1）記載の動物、
- 20 （3）ゲッ歯動物がマウスまたはラットである上記（2）記載の動物、および
- （4）本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターなどを提供する。

本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明のDNA導入動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始
25 原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより目的とするDNAを導入することによって作出することが

できる。また、該DNA導入方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを導入し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA導入動物を作出することもできる。

- 5 非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F₁系統、BDF₁系統、B6D2F₁系統、BALB/c系統、ICR系統など）またはラット（
10 例えば、Wistar, SDなど）などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

- 本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNA
15 ではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

- 該異常DNAとしては、異常な本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター
20 を発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの機能を抑制するポリペプチドを発現させるDNAなどが用いられる。

- 本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に導入するにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNA
25 コンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを導入する場合、これと相同性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを

95

結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA導入哺乳動物を作出することができる。

本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、入
5 ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウィルスなどのレトロウィルス、ワクシニアウィルスまたはバキュロウィルスなどの動物ウィルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

- 10 上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、①ウィルス（例、シミアンウィルス、サイトメガロウィルス、モロニー白血病ウィルス、JCウィルス、乳癌ウィルス、ポリオウィルスなど）に由来するDNAのプロモーター、②各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラ
15 ット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンII、ウロプラキンII、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 β 、ケラチンK1、K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存タンパク質キナーゼ β Iサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリホスファターゼ、心房ナトリウム
20 利尿性因子、内皮レセプターチロシinkinase（一般にTie2と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素（Na, K-ATPase）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロティナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原（H-2L）、H-ras、レニン、ドーパミン β -水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ（TPO）、ポリペ
25 チド鎖延長因子1 α （EF-1 α ）、 β アクチン、 α および β ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部（VNP）、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋 α アクチン、プレプロエンケファリンA、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現す

ることが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトポリペプチド鎖延長因子 1α (EF- 1α) のプロモーター、ヒトおよびニワトリ β アクチンプロモーターなどが好適である。

上記ベクターは、DNA導入哺乳動物において目的とするmRNAの転写を終
5 結する配列（一般にターミネターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネターなどが用いられる。

その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などを
10 プロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

正常な本発明のポリペプチドの翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNA
15 ライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することが出来る。また、外来性の異常DNAは、上記の細胞または組織より得られた正常なポリペプチドの翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。

20 該翻訳領域はDNA導入動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの導入は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA導入後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

本発明の外来性正常DNAを導入した非ヒト哺乳動物は、交配により外来性D

NAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

受精卵細胞段階における本発明の外來性DNAの導入は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA導入後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外來性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外來性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外來性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外來性DNAを過剰に有する。

- 10 導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。

本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA導入動物を用いて、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの機能亢進症や、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターに関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

- 20 また、本発明の外來性正常DNAを導入した哺乳動物は、遊離した本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの増加症状を有することから、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターに関連する疾患（例、肥満症、癌など）に対する予防・治療剤のスクリーニング試験にも利用可能である。

一方、本発明の外來性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外來性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外來DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの導入は、対象哺乳動物の胚芽細胞および

体細胞の全てに存在するように確保される。DNA導入後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA導入動物を用いて、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの機能不活性型不応症における本発明の異常ポリペプチドまたは本発明の異常レセプターによる正常ポリペプチドまたはレセプターの機能阻害（dominant negative作用）を解明するモデルとなる。

また、本発明の外来異常DNAを導入した哺乳動物は、遊離した本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの増加症状を有することから、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

また、上記2種類の本発明のDNA導入動物のその他の利用可能性として、例えば、

- ①組織培養のための細胞源としての使用、
- ②本発明のDNA導入動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現されたポリペプチドまたはレセプター組織を分析することによる、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターにより特異的に発現

あるいは活性化するポリペプチドまたはレセプターとの関連性についての解析、
③DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、

④上記③記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および

⑤本発明の変異ポリペプチドまたはレセプターを単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

さらに、本発明のDNA導入動物を用いて、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの機能不活性型不応症などを含む、本発明のポリペプチドまたは
10 本発明のレセプターに関連する疾患（例、癌、肥満症など）の臨床症状を調べることができ、また、本発明のポリペプチドに関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

また、本発明のDNA導入動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離したDNA導入細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターおよびその作用解明のための有効な研究材料となる。
15

さらに、本発明のDNA導入動物を用いて、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの機能不活性型不応症を含む、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターに関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供
25 することが可能となる。また、本発明のDNA導入動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明のポリペプチドが関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

（８）ノックアウト動物

本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本

100

発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- (1) 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、
- (2) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺
- 5 伝子）を導入することにより不活性化された上記（1）記載の胚幹細胞、
- (3) ネオマイシン耐性である上記（1）記載の胚幹細胞、
- (4) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である上記（1）記載の胚幹細胞、
- (5) ゲッ歯動物がマウスである上記（4）記載の胚幹細胞、
- (6) 本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、
- 10 (7) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺
伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNA
に対するプロモーターの制御下で発現しうる上記（6）記載の非ヒト哺乳動物
、
- (8) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である上記（6）記載の非ヒト哺乳動物、
- 15 (9) ゲッ歯動物がマウスである上記（8）記載の非ヒト哺乳動物、および
(10) 上記（7）記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発
現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進
または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

- 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳
- 20 動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現
能を抑制するか、あるいは該DNAがコードしている本発明のポリペプチドまた
は本発明のレセプターの活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的
に本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの発現能を有さない（以下、
本発明のノックアウトDNAと称することがある）非ヒト哺乳動物の胚幹細胞（
 - 25 以下、ES細胞と略記する）をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的
手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させ
ることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読

101

み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエクソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する）の具体
5 例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエクソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ（ β -ガラクトシダーゼ遺伝子）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエクソンの機能を破壊するか、
10 あるいはエクソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、ポリA付加シグナルなど）を挿入し、完全なmRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（以下、ターゲッティングベクターと略記する）を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上
15 あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。

20 また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知のEvansとKaufmanの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスや
25 C57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF₁マウス（C57BL/6とDBA/2とのF₁）を用いて樹立したものなども良好に用いる。BDF₁マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られた

E S細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C 5 7 B L / 6 マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC 5 7 B L / 6 マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

また、E S細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

また、雌雄いずれのE S細胞を用いてもよいが、通常雄のE S細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

10 E S細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、P C R法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約 10^6 個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のE S細胞数（約50個）で済むので、培養初期におけるE S細胞の第一次セクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

また、第二次セクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるE S細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、E S細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞（例えば、マウスでは染色体数が $2n=40$ である細胞）に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、S T O繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でL I F（1-1000 U/ml）存在下に炭酸ガス培養器内（好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気）で約37℃で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液（通常0.001-0.5%トリプシン/0.1-5 mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1 mM EDTA）処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に

播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1－3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり〔M. J. Evans及びM. H. Kaufman, Nature 第292巻、154頁、1981年；G. R. Martin Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 第78巻、7634頁、1981年；T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年〕、本発明のES細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの細胞生物学的検討において有用である。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知の方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。

該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをノックアウトさせることができる。

本発明のDNAがノックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚ま

たは胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、この
5 ようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターのヘテロ発現不全個体であり、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの
10 ヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターのホモ発現不全個体を得ることができる。

卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェ
15 ニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、
20 該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1，ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の
25 雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のポリペプチドまた

は本発明のレセプターにより誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

- 5 (8 a) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

- 10 すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病、例えば、肥満症（例、悪性肥満細胞症、外因性肥満、過インシュリン性肥満症、過血漿性肥満、下垂体性肥満、減血漿性肥満症、甲状腺機能低下肥満症、視床下部性肥満、症候性肥満症、小児肥満、上半身肥満、
15 、食事性肥満症、性機能低下性肥満、全身性肥満細胞症、単純性肥満、中心性肥満など）、摂食亢進症などに対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

- 20 試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

- 25 具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質な

どにあわせて適宜選択することができる。

例えば、肥満症（例、悪性肥満細胞症、外因性肥満、過インシュリン性肥満症、過血漿性肥満、下垂体性肥満、減血漿性肥満症、甲状腺機能低下肥満症、視床下部性肥満、症候性肥満症、小児肥満、上半身肥満、食事性肥満症、性機能低下性肥満、全身性肥満細胞症、単純性肥満、中心性肥満など）、摂食亢進症などに
5 に対して予防・治療効果を有する化合物をスクリーニングする場合、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に糖負荷処置を行ない、糖負荷処置前または処置後に試験化合物を投与し、該動物の血糖値および体重変化などを経時的に測定する。

該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、該試験動物の癌転移が約10%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上低下した場合、該試験化合物を肥満症に対して予防・治療効果を有する化合物として選択することができる。

該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のポリペプチドの欠損や損傷などによって引き起こされる疾患、例えば、肥満症（例、悪性肥満細胞症、外因性肥満、過インシュリン性肥満症、過血漿性肥満、下垂体性肥満、減血漿性肥満症、甲状腺機能低下肥満症、視床下部性肥満、症候性肥満症、小児肥満、上半身肥満、食事性肥満症、性機能低下性肥満、全身性肥満細胞症、単純性肥満、中心性肥満など）、摂食亢進症などに対して予防・治療効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な
15 予防・治療剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸など）や塩基（例、アルカリ金属など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のポリペプチドを含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重 60 kg として）の肥満症の患者においては、一日につき該化合物を約 0.1 ~ 100 mg、好ましくは約 1.0 ~ 50 mg、より好ましくは約 1.0 ~ 20 mg 投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の 1 回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、該化合物を注射剤の形で通常成人（60 kg として）の癌の患者に投与する場合、一日につき該化合物を約 0.01 ~ 30 mg 程度、好ましくは約 0.1 ~ 20 mg 程度、より好ましくは約 0.1 ~ 10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当たりに換算した量を投与することができる。

（8b）本発明の DNA に対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物をスクリーニング方法

本発明は、本発明の DNA 発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明の DNA に対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

上記スクリーニング方法において、本発明の DNA 発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明の DNA 発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明の DNA がレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明の DNA に対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。

試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子（lacZ）、可溶性アルカリホスファターゼ遺伝子またはルシフェ

ラーゼ遺伝子などが好適である。

本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

例えば、本発明のポリペプチドをコードするDNA領域の一部を大腸菌由来のlacZで置換している場合、本来、本発明のポリペプチドの発現する組織で、本発明のポリペプチドの代わりにβ-ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-ガラクトピラノシド(X-gal)のようなβ-ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のポリペプチドの動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のポリペプチド欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液(PBS)で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS溶液で洗浄することによって、β-ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、lacZをコードするmRNAを検出してもよい。

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸(例、無機酸など)や塩基(例、有機酸など)などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など)との塩などが用いられる。

本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの発現を促進し、該ポリペプチ

ドまたは本発明のレセプターの活性または機能を促進することができるので、例えば、肥満症（例、悪性肥満細胞症、外因性肥満、過インシュリン性肥満症、過血漿性肥満、下垂体性肥満、減血漿性肥満症、甲状腺機能低下肥満症、視床下部性肥満、症候性肥満症、小児肥満、上半身肥満、食事性肥満症、性機能低下性肥満、全身性肥満細胞症、単純性肥満、中心性肥満など）、摂食亢進症などの予防・治療剤などの低毒性で安全な医薬として有用である。あるいは、例えば、中枢疾患（例、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害など）、内分泌疾患（例、高血圧症、性腺機能異常、甲状腺機能異常、下垂体機能異常など）、代謝疾患（例、糖尿病、脂質代謝異常、高脂血症など）などの医薬として有用である。中でも好ましくは、肥満症の予防・治療剤などである。

また、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの発現を阻害し、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの活性または機能を阻害することができるので、例えば、癌（例、大腸癌、結腸癌、直腸癌、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、子宮頸部癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）の予防・治療剤、摂食（食欲）促進剤、拒食症の予防・治療剤、アポトーシス誘導剤などの低毒性で安全な医薬として有用である。あるいは、中枢疾患（例、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害など）、内分泌疾患（例、高血圧症、性腺機能異常、甲状腺機能異常、下垂体機能異常など）、代謝疾患（例、糖尿病、脂質代謝異常、高脂血症など）などの安全で低毒性な予防・治療剤などの医薬として有用である。好ましくは、癌の予防・治療剤、摂食促進剤などである。

さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のスクリーニング方法で得られる化合物またはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウ

シ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の肥満症の患

5 者においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）の肥満症の患者に投与する場合、一日につき
10 該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

一方、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の癌の患者においては
15 、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）の癌の患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.
20 01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニ
25 ングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。

また、本発明のポリペプチドのプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々のタンパク質をコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子移入動物）を作成すれば、

111

特異的にそのポリペプチドを合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターそのものの体内での産生能力を特異的に促進または阻害（抑制）する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

（９）本発明の「本発明のポリペプチドの活性を促進する化合物またはその塩を含有してなる肥満症の予防・治療剤」および「本発明のポリペプチドの活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる癌の予防・治療剤」について

「本発明のポリペプチドの活性を促進する化合物」は、本発明のポリペプチドの活性を促進する化合物であればいかなるものでもよく、例えば肥満症（例、悪性肥満細胞症、外因性肥満、過インシュリン性肥満症、過血漿性肥満、下垂体性肥満、減血漿性肥満症、甲状腺機能低下肥満症、視床下部性肥満、症候性肥満症、小児肥満、上半身肥満、食事性肥満症、性機能低下性肥満、全身性肥満細胞症、単純性肥満、中心性肥満など）の予防・治療剤などとして用いられる。

「本発明のポリペプチドの活性を阻害する化合物」は、本発明のポリペプチドの活性を阻害する化合物であればいかなるものでもよく、例えば癌（例、大腸癌、結腸癌、直腸癌、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、子宮頸部癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）の予防・治療剤などの低毒性で安全な医薬として有用である。

該予防・治療剤は、上記（２）などと同様にして製造される。

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン

112

	T	: チミン
	G	: グアニン
	C	: シトシン
	I	: イノシン
5	R	: アデニン (A) またはグアニン (G)
	Y	: チミン (T) またはシトシン (C)
	M	: アデニン (A) またはシトシン (C)
	K	: グアニン (G) またはチミン (T)
	S	: グアニン (G) またはシトシン (C)
10	W	: アデニン (A) またはチミン (T)
	B	: グアニン (G) 、グアニン (G) またはチミン (T)
	D	: アデニン (A) 、グアニン (G) またはチミン (T)
	V	: アデニン (A) 、グアニン (G) またはシトシン (C)
	N	: アデニン (A) 、グアニン (G) 、シトシン (C) もしく
15		はチミン (T) または不明もしくは他の塩基
	RNA	: リボ核酸
	mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
	dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
20	dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
	dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
	ATP	: アデノシン三リン酸
	EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
	SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
25	BHA	: ベンズヒドリルアミン
	pMBHA	: p-メチルベンズヒドリルアミン
	Tos	: p-トルエンスルフォニル
	Bzl	: ベンジル
	Bom	: ベンジルオキシメチル

118

	B o c	: t-ブチルオキシカルボニル
	D C M	: ジクロロメタン
	H O B t	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
	D C C	: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド
5	T F A	: トリフルオロ酢酸
	D I E A	: ジイソプロピルエチルアミン
	B S A	: ウシ血清アルブミン
	C H A P S	: 3-〔(3-コラミドプロピル) ジメチルアンモニオ〕- 1-プロパンスホナート
10	G l y 又は G	: グリシン
	A l a 又は A	: アラニン
	V a l 又は V	: バリン
	L e u 又は L	: ロイシン
	I l e 又は I	: イソロイシン
15	S e r 又は S	: セリン
	T h r 又は T	: スレオニン
	C y s 又は C	: システイン
	M e t 又は M	: メチオニン
	G l u 又は E	: グルタミン酸
20	A s p 又は D	: アスパラギン酸
	L y s 又は K	: リジン
	A r g 又は R	: アルギニン
	H i s 又は H	: ヒスチジン
	P h e 又は F	: フェニルアラニン
25	T y r 又は Y	: チロシン
	T r p 又は W	: トリプトファン
	P r o 又は P	: プロリン
	A s n 又は N	: アスパラギン
	G l n 又は Q	: グルタミン

114

	p G l u	: ピログルタミン酸
	T y r (I)	: 3-ヨードチロシン
	DMF	: N, N-ジメチルホルムアミド
	Fm o c	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
5	T r t	: トリチル
	P b f	: 2, 2, 4, 6, 7-ペンタメチルジヒドロベンゾフラン -5-スルホニル
	C l t	: 2-クロロトリチル
	B u ^t	: t-ブチル
10	M e t (O)	: メチオニンスルフォキシド
	P A M	: フェニルアセトアミドメチル
	D I P C I	: N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド
	C l - Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
	H O A t	: 1-ヒドロキシー-7-アザベンゾトリアゾール
15	P y A o p	: 7-アザベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリスピロ リジノホスホニウム ヘキサフルオロホスフェイト
	D I P C D I	: 1, 3-ジイソプロピルカルボジイミド
	N l e	: ノルロイシン (2-アミノヘキサン酸)
	P M S F	: フェニルメタンスルホニルフルオリド
20	C l - Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
	B r - Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
	Fmoc-Lys (Boc) -Thr (Psi (Me, Me) pro) -OH :	
	(4S, 5R) -3- (Fmoc-Lys (Boc) -2, 2, 5-トリメチル-オキサゾリジン-4-カルボン酸	
	[(4S, 5R) -3- (Fmoc-Lys (Boc) -2, 2, 5-trimethyl-oxazolidine-4-carboxylic	
25	acid)]	

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

[配列番号：1]

ヒト由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質TGR23-1 (ヒトTG

R 2 3 - 1) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：2〕

ヒト由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質TGR 2 3 - 1 をコードするcDNAの塩基配列を示す。

5 〔配列番号：3〕

ヒト由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質TGR 2 3 - 2 (ヒトTGR 2 3 - 2) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：4〕

10 ヒト由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質TGR 2 3 - 2 をコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：5〕

以下の参考例1、実施例28、実施例32および実施例33におけるPCR反応で使用したプライマー1の塩基配列を示す。

〔配列番号：6〕

15 以下の参考例1、実施例28、実施例32および実施例33におけるPCR反応で使用したプライマー2の塩基配列を示す。

〔配列番号：7〕

以下の実施例1および実施例15におけるPCR反応で使用したプライマー1の塩基配列を示す。

20 〔配列番号：8〕

以下の実施例1および実施例15におけるPCR反応で使用したプライマー2の塩基配列を示す。

〔配列番号：9〕

25 以下の実施例2、実施例16、参考例2、実施例31、実施例39および実施例47で使用したプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：10〕

以下の実施例2、実施例16、参考例2、実施例31、実施例39および実施例47で使用したプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：11〕

116

以下の実施例 2、実施例 16、参考例 2、実施例 31、実施例 39 および実施例 47 で使用したプローブの塩基配列を示す。

〔配列番号：12〕

ラット TGR23-2 リガンド (1-18) のアミノ酸配列を示す。

5 〔配列番号：13〕

ラット TGR23-2 リガンド (1-15) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：14〕

ラット TGR23-2 リガンド (1-14) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：15〕

10 以下の実施例 11 における PCR 反応で使用したプライマーの塩基配列を示す。
。

〔配列番号：16〕

以下の実施例 11 における PCR 反応で使用したプライマーの塩基配列を示す。
。

15 〔配列番号：17〕

以下の実施例 11 における PCR 反応で使用したプライマーの塩基配列を示す。
。

〔配列番号：18〕

ヒト TGR23-2 リガンド前駆体をコードする cDNA の塩基配列を示す。

20 〔配列番号：19〕

ヒト TGR23-2 リガンド前駆体のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：20〕

ヒト TGR23-2 リガンド (1-18) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：21〕

25 ヒト TGR23-2 リガンド (1-15) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：22〕

ヒト TGR23-2 リガンド (1-14) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：23〕

ヒト TGR23-2 リガンド (1-20) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：24〕

以下の実施例12におけるPCR反応で使用したプライマーの塩基配列を示す

。

〔配列番号：25〕

5 以下の実施例12におけるPCR反応で使用したプライマーの塩基配列を示す

。

〔配列番号：26〕

以下の実施例12におけるPCR反応で使用したプライマーの塩基配列を示す

。

10 〔配列番号：27〕

マウスTGR23-2リガンド前駆体をコードするcDNAの塩基配列を示す

。

〔配列番号：28〕

マウスTGR23-2リガンド前駆体のアミノ酸配列を示す。

15 〔配列番号：29〕

マウスTGR23-2リガンド（1-18）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：30〕

マウスTGR23-2リガンド（1-15）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：31〕

20 マウスTGR23-2リガンド（1-14）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：32〕

マウスTGR23-2リガンド（1-20）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：33〕

以下の実施例13におけるPCR反応で使用したプライマーの塩基配列を示す

25 。

〔配列番号：34〕

ラットTGR23-2リガンド前駆体の一部をコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：35〕

118

ラットTGR23-2リガンド前駆体の一部のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：36〕

ラットTGR23-2リガンド（1-20）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：37〕

5 配列番号：12で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：38〕

配列番号：13で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：39〕

配列番号：14で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

10 〔配列番号：40〕

配列番号：36で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：41〕

配列番号：20で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：42〕

15 配列番号：21で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：43〕

配列番号：22で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：44〕

配列番号：23で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

20 〔配列番号：45〕

配列番号：29で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：46〕

配列番号：30で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：47〕

25 配列番号：31で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：48〕

配列番号：32で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：49〕

ヒトTGR23-2リガンド（1-16）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：50〕

配列番号：49で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：51〕

ヒト由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質のアミノ酸配列を示す。

5 〔配列番号：52〕

配列番号：51で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：53〕

ヒト由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：54〕

10 配列番号：53で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：55〕

ヒト由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：56〕

配列番号：55で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

15 〔配列番号：57〕

以下の実施例14におけるPCR反応で使用したプライマーの塩基配列を示す

。

〔配列番号：58〕

以下の実施例14におけるPCR反応で使用したプライマーの塩基配列を示す

20 。

〔配列番号：59〕

以下の実施例14におけるPCR反応で使用したプライマーの塩基配列を示す

。

〔配列番号：60〕

25 ラットTGR23-2リガンド前駆体をコードするcDNAの塩基配列を示す

。

〔配列番号：61〕

ラットTGR23-2リガンド前駆体のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：62〕

120

[N l e¹⁰, T y r¹⁵] ヒト T G R 2 3 - 2 リガンド (1 - 2 0) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号： 6 3〕

新規 G タンパク質共役型レセプタータンパク質 T G R 2 3 - 1 A (ヒト T G R
5 2 3 - 1 A) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号： 6 4〕

ヒト T G R 2 3 - 1 A をコードする c D N A の塩基配列を示す。

〔配列番号： 6 5〕

新規 G タンパク質共役型レセプタータンパク質 T G R 2 3 - 1 B (ヒト T G R
10 2 3 - 1 B) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号： 6 6〕

ヒト T G R 2 3 - 1 B をコードする c D N A の塩基配列を示す。

〔配列番号： 6 7〕

ヒト由来 G タンパク質共役型レセプタータンパク質のアミノ酸配列を示す。

15 〔配列番号： 6 8〕

配列番号： 6 7 で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号： 6 9〕

ヒト由来 G タンパク質共役型レセプタータンパク質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号： 7 0〕

20 配列番号： 6 9 で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号： 7 1〕

マウス由来新規 G タンパク質共役型レセプタータンパク質 T G R 2 3 - A (マウス T G R 2 3 - A と称することもある) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号： 7 2〕

25 マウス由来新規 G タンパク質共役型レセプタータンパク質 T G R 2 3 - A をコードする c D N A の塩基配列を示す。

〔配列番号： 7 3〕

以下の参考例 3 における P C R 反応で使用したプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号： 7 4〕

121

以下の参考例 3 における P C R 反応で使用したプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号： 7 5〕

マウス由来新規 G タンパク質共役型レセプタータンパク質 T G R 2 3 - B （マウス T G R 2 3 - B と称することもある）のアミノ酸配列を示す。

5 〔配列番号： 7 6〕

マウス由来新規 G タンパク質共役型レセプタータンパク質 T G R 2 3 - B をコードする c D N A の塩基配列を示す。

〔配列番号： 7 7〕

10 ラット由来新規 G タンパク質共役型レセプタータンパク質 T G R 2 3 - 1 （ラット T G R 2 3 - 1 と称することもある）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号： 7 8〕

ラット由来新規 G タンパク質共役型レセプタータンパク質 T G R 2 3 - 1 をコードする c D N A の塩基配列を示す。

〔配列番号： 7 9〕

15 以下の参考例 4 および実施例 3 0 における P C R 反応で使用したプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号： 8 0〕

以下の参考例 4 および実施例 3 0 における P C R 反応で使用したプライマーの塩基配列を示す。

20 〔配列番号： 8 1〕

以下の実施例 2 9 における P C R 反応で使用したプライマーの塩基配列を示す。

。

〔配列番号： 8 2〕

以下の実施例 2 9 における P C R 反応で使用したプライマーの塩基配列を示す。

25 。

〔配列番号： 8 3〕

本発明のマウス由来新規 G タンパク質共役型レセプタータンパク質 T G R 2 3 - C （マウス T G R 2 3 - C と称することもある）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号： 8 4〕

122

本発明のマウス由来新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質TGR23-
CをコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：85〕

5 本発明のラット由来新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質TGR23-
2（ラットTGR23-2と称することもある）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：86〕

本発明のラット由来新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質TGR23-
2をコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：87〕

10 本発明のラット由来新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質TGR23-
3（ラットTGR23-3と称することもある）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：88〕

本発明のラット由来新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質TGR23-
3をコードするcDNAの塩基配列を示す。

15 〔配列番号：89〕

本発明のラット由来新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質TGR23-
4（ラットTGR23-4と称することもある）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：90〕

20 本発明のラット由来新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質TGR23-
4をコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：91〕

本発明のラット由来新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質TGR23-
5（ラットTGR23-5と称することもある）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：92〕

25 本発明のラット由来新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質TGR23-
5をコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：93〕

本発明のラット由来新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質TGR23-
6（ラットTGR23-2と称することもある）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：94〕

本発明のラット由来新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質TGR23-6をコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：95〕

- 5 ヒト結腸癌細胞LS 174Tより得られた新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質TGR23-1C（ヒトTGR23-1C）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：96〕

配列番号：95をコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：97〕

- 10 ヒト結腸癌細胞LS 180より得られた新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質TGR23-1D（ヒトTGR23-1D）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：98〕

配列番号：97をコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：99〕

- 15 ヒト胃癌細胞KATOIIIより得られた新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質TGR23-1C（ヒトTGR23-1C）をコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：100〕

配列番号：95をコードするcDNAの塩基配列を示す。

- 20 〔配列番号：101〕

配列番号：3をコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：102〕

新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質TGR23-1E（ヒトTGR23-1E）のアミノ酸配列を示す。

- 25 〔配列番号：103〕

ヒトTGR23-1EをコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：104〕

新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質TGR23-1F（ヒトTGR23-1F）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：105〕

ヒトTGR23-1FをコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：106〕

ヒトTGR23-1AをコードするDNAを作製するために用いたプライマー
5 の塩基配列を示す。

〔配列番号：107〕

ヒトTGR23-1AをコードするDNAを作製するために用いたプライマー
の塩基配列を示す。

〔配列番号：108〕

10 ヒトTGR23-1CをコードするDNAを作製するために用いたプライマー
の塩基配列を示す。

〔配列番号：109〕

ヒトTGR23-1CをコードするDNAを作製するために用いたプライマー
の塩基配列を示す。

15 〔配列番号：110〕

ヒトTGR23-1DをコードするDNAを作製するために用いたプライマー
の塩基配列を示す。

〔配列番号：111〕

20 ヒトTGR23-1DをコードするDNAを作製するために用いたプライマー
の塩基配列を示す。

〔配列番号：112〕

ヒトTGR23-1BをコードするDNAを作製するために用いたプライマー
の塩基配列を示す。

〔配列番号：113〕

25 ヒトTGR23-1BをコードするDNAを作製するために用いたプライマー
の塩基配列を示す。

〔配列番号：114〕

実施例39においてヒトTGR23-2部分DNAを増幅するために用いたプ
ライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：115〕

実施例39においてヒトTGR23-2部分DNAを増幅するために用いたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：116〕

- 5 ラットTGR23-5をコードするDNAを作製するために用いたプライマー配列を示す。

〔配列番号：117〕

ラットTGR23-5をコードするDNAを作製するために用いたプライマー配列を示す。

- 10 〔配列番号：118〕

実施例43においてラットTGR23-1部分DNAを増幅するために用いたプライマー配列を示す。

〔配列番号：119〕

- 15 実施例43においてラットTGR23-1部分DNAを増幅するために用いたプライマー配列を示す。

〔配列番号：120〕

実施例43において使用したプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：121〕

実施例43において使用したプライマーの塩基配列を示す。

- 20 〔配列番号：122〕

実施例43において使用したプローブの塩基配列を示す。

〔配列番号：123〕

実施例46および実施例47で用いられたアンチセンスオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

- 25 〔配列番号：124〕

実施例46および実施例47で用いられたオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

後述の参考例1で得られた形質転換体大腸菌 (Escherichia coli)

TOP10/pTB2173は、2000年10月24日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85（郵便番号532-8686）の財団法人・発酵研究所（IFO）に受託番号IFO 16483として、2000年11月1日から茨城県つくば市東1-1-1 中央第6（郵便番号305-8566）の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（旧NIBH）に受託番号FERM BP-7346としてそれぞれ寄託されている。

後述の参考例1で得られた形質転換体大腸菌 (*Escherichia coli*)

TOP10/pTB2174は、2000年10月24日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85（郵便番号532-8686）の財団法人・発酵研究所（IFO）に受託番号IFO 16484として、2000年11月1日から茨城県つくば市東1-1-1 中央第6（郵便番号305-8566）の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（旧NIBH）に受託番号FERM BP-7347としてそれぞれ寄託されている。

後述の実施例11で得られた形質転換体*Escherichia coli* JM109/pGEM-T Easy Human TGR23(2) Ligand Precursorは、2001年10月12日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85（郵便番号532-8686）の財団法人・発酵研究所（IFO）に受託番号IFO 16714として、2001年10月22日から茨城県つくば市東1-1-1 中央第6（郵便番号305-8566）の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号FERM BP-7781としてそれぞれ寄託されている。

後述の実施例12で得られた形質転換体*Escherichia coli* JM109/pGEM-T Easy Mouse TGR23(2) Ligand Precursorは、2001年10月12日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85（郵便番号532-8686）の財団法人・発酵研究所（IFO）に受託番号IFO 16715として、2001年10月22日から茨城県つくば市東1-1-1 中央第6（郵便番号305-8566）の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号FERM BP-7783としてそれぞれ寄託されている。

後述の実施例14で得られた形質転換体*Escherichia coli* JM109/pGEM-T Easy Rat TGR23(2) Ligand Precursorは、2001年10月12日から大阪府大阪市

淀川区十三本町 2-17-85 (郵便番号 532-8686) の財団法人・発酵研究所 (IFO) に受託番号 IFO 16716 として、2001 年 10 月 22 日から茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6 (郵便番号 305-8566) の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号 FERM

5 BP-7782 としてそれぞれ寄託されている。

後述の実施例 29 で得られた形質転換体 *Escherichia coli* DH5 α /pCR2.1-mTGR23-B は、2002 年 6 月 18 日から茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6 (郵便番号 305-8566) の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号 FERM BP-8078 として寄託されている。

10 後述の参考例 4 で得られた形質転換体 *Escherichia coli* DH5 α /pCR2.1-rTGR23-1 は、2002 年 6 月 18 日から茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6 (郵便番号 305-8566) の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号 FERM BP-8079 として寄託されている。

後述の実施例 36 で得られた形質転換体 *Escherichia coli* TOP10/pAKK0-hTGR23-1A は、2002 年 6 月 27 日から茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6 (郵便番号 305-8566) の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号 FERM BP-8092 として寄託されている。

20 後述の実施例 37 で得られた形質転換体 *Escherichia coli* TOP10/pAKK0-hTGR23-1B は、2002 年 6 月 27 日から茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6 (郵便番号 305-8566) の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号 FERM BP-8093 として寄託されている。

25 後述の実施例 36 で得られた形質転換体 *Escherichia coli* DH5 α /pAKK0-hTGR23-1C は、2002 年 6 月 27 日から茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6 (郵便番号 305-8566) の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号 FERM BP-8094 として寄託されている。

後述の実施例 36 で得られた形質転換体 *Escherichia coli* DH5 α /pAKK0-hTGR23-1D は、2002 年 6 月 27 日から茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6 (郵便番号 305-8566) の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号 FERM BP-8095 として寄託されている。

後述の実施例 41 で得られた形質転換体 *Escherichia coli* DH5 α /pAKK0-rTGR23-5 は、2002 年 9 月 6 日から茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6（郵便番号 305-8566）の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号 FERM BP-8178 として寄託されている。

5

実施例

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

以下で取得されたヒト TGR23-1、ヒト TGR23-2、ヒト TGR23-1A、ヒト TGR23-1B、ヒト TGR23-1C およびヒト TGR23-1D をヒト TGR23 と略すこともある。ヒト TGR23 には、上記タンパク質の変異体も含まれることもある。また、これらヒト TGR23 をコードする遺伝子をヒト TGR23 遺伝子と称する。

15 参考例 1

ヒト結腸癌由来 G タンパク質共役型レセプタータンパク質をコードする cDNA のクローニングと塩基配列の決定

ヒト結腸癌 (CX-1) cDNA (CLONTECH 社) を鋳型とし、2 個のプライマー、プライマー 1（配列番号：5）およびプライマー 2（配列番号：6）を用いて PCR 反応を行った。該反応における反応液の組成は上記 cDNA 5 μ l を鋳型として使用し、Pfu Turbo DNA Polymerase (STRATAGENE 社) 2.5 U、プライマー 1（配列番号：5）およびプライマー 2（配列番号：6）を各 1.0 μ M、dNTPs を 200 μ M、および酵素に 2XGC Buffer I (TaKaRa 社) を 25 μ l 加え、50 μ l の液量とした。PCR 反応は、95℃・1 分の後、95℃・1 分、60℃・1 分、72℃・1.5 分のサイクルを 38 回繰り返し最後に 72℃・10 分の伸長反応を行った。該 PCR 反応産物を Zero Blunt TOPO PCR クローニングキット（Invitrogen 社）の処方に従いプラスミドベクター pCR-BluntII-TOPO（Invitrogen 社）へサブクローニングした。これを大腸菌 TOP10 に導入し、cDNA を持つクローンをカナマイシンを含む LB 寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解

析した結果、新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするcDNAの塩基配列（配列番号：2および配列番号：4）を得た。配列番号：2で表される塩基配列を有するDNA断片を有するプラスミドをpTB2173と、配列番号：4で表される塩基配列を有するDNA断片を有するプラスミドをpTB2174と名付けた

- 5 。これらのDNAの塩基配列（配列番号：2および配列番号：4）がコードするアミノ酸配列（配列番号：1および配列番号：3）を含有する新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をTGR23-1（ヒトTGR23-1）およびTGR23-2（ヒトTGR23-2）とそれぞれ命名した。さらに、プラスミドpTB2173およびpTB2174が導入された形質転換体を、それぞれ、大腸菌（*Escherichia coli*）TOP10/pTB2173
10 およびTOP10/pTB2174と命名した。

- TGR23-2のアミノ酸配列では、TGR23-1のアミノ酸配列の107番目のAsnがIleに、344番目のGlnがArgにそれぞれ置換されている。また、TGR23-2をコードするDNAの塩基配列では、TGR23-1をコードするDNAの塩基配列の320番目のAがTに、648番目のCがTに
15 、1031番目のAがGに、1071番目のTがCにそれぞれ置換されている。

TGR23-1の疎水性プロット図を図1に、TGR23-2の疎水性プロット図を図2にそれぞれ示す。

参考例2

- 20 ヒトTGR23-1およびヒトTGR23-2の癌細胞株での発現検討

- 癌細胞株SW620（ヒト結腸癌由来）、LS123（ヒト結腸癌由来）、COL0205（ヒト結腸癌由来）、DU145（ヒト前立腺癌由来）、ZR75-1（ヒト乳癌由来）、NCI-H358（ヒト気管支肺胞腺癌由来）（いずれもアメリカンタイプカルチャーコレクション（ATCC））を用いてヒトTGR23-1およびTGR23-2の発現量の検討を行った。
25 SW620はLeibovitz's L15培地（SIGMA社、カタログ番号L5520）、LS123はEMEM培地（GIBCO社、カタログ番号11090-081）、COL0205、ZR75-1、NCI-H358は10mM HEPES（GIBCO社）、1mM Sodium Pyruvate（GIBCO社）を含むRPMI1640培地（GIBCO社、カタログ番号11875-093）、DU145は0.1mM MEM 非必須アミノ酸溶液、1mM Sodium Pyruvate（GIBCO社）を含むEMEM培地（GIBCO

社、カタログ番号11095-080) にいずれの培地も、それぞれ10% ウシ胎児血清 (GIBCO社)、0.1 g/l のカナマイシン (GIBCO社) になるようにそれらを加え、培養を行った。細胞培養は10cm-dishにておこないRNeasy Mini Kit (QIAGEN社) を用いてRNAを調製した。得られたRNAの260 nmの吸光度を測定して濃度を算出し、それぞれ5 ngを用いTaqMan Reverse Transcription Reagents (アプライドバイオシステムズ社) を用いて逆転写反応を行った。得られた逆転写産物1 ng相当もしくは逆転写反応を行っていないRNA 1 ngを鋳型とし、2個のプライマー、プライマー1 (配列番号: 9)、プライマー2 (配列番号: 10) およびプローブ1 (配列番号: 11) を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記逆転写反応産物1 ng相当もしくは逆転写反応を行っていないRNA 1 ngを鋳型として使用し、プライマー1 (配列番号: 9) およびプライマー2 (配列番号: 10) を各0.5 μ M、プローブ1 (配列番号: 11) を0.1 μ M、およびTaqMan Universal PCR Master Mix (アプライドバイオシステムズ社) 12.5 μ lを加え、25 μ lの液量とした。PCR反応は、ABI7700 (アプライドバイオシステムズ社) を用いて50℃・2分、95℃・10分の後、95℃・15秒、60℃・1分のサイクルを40回繰り返し行った。同様に逆転写産物0.25 ng相当もしくは逆転写反応を行っていないRNA 0.25 ngを鋳型として使用し、TaqMan β -actin Control Reagents (アプライドバイオシステムズ社) を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記逆転写産物0.25 ng相当もしくは逆転写反応を行っていないRNA 0.25 ngを鋳型として使用し、TaqMan β -actin Control Reagentsに含まれる β -actin Forward Primerおよび β -actin Reverse Primerを各0.4 μ M、 β -actin Probeを0.5 μ M、およびTaqMan Universal PCR Master Mix (アプライドバイオシステムズ社) 12.5 μ lを加え、25 μ lの液量とした。PCR反応は、ABI7700 (アプライドバイオシステムズ社) を用いて50℃・2分、95℃・10分の後、95℃・15秒、62℃・1分のサイクルを40回繰り返し行った。実施例2と同様に解析を行い、逆転写反応産物の解析より得られた値から逆転写反応を行わずに得られた値を差し引き、発現量を決定した。さらにヒトTGR23-1およびTGR23-2の発現

131

量の値は β -アクチンに対しての発現量として求めた。このとき得られた値が0以下を示した場合、その値を0として置き換えた。その結果、 β -アクチンに対するヒトTGR23-1およびTGR23-2の発現量はSW620では、0.0021%、LS123では0.0%、COL0205では2.1%、DU145では0.00029%、ZR75-1では0.0012%、NCI-H358では0.0%であった。

これより、ヒトTGR23-1およびヒトTGR23-2は、COL0205において非常に発現が増強していたことがわかる。

ヒトTGR23-1およびヒトTGR23-2の癌細胞株における発現量のグラフを図19に示す。

参考例3

マウス脳由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするcDNAのクローニングと塩基配列の決定

マウスMarathon Ready cDNA (CLONTECH社)を鋳型とし、2個のプライマー、プライマー1 (配列番号: 73) およびプライマー2 (配列番号: 74) を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記cDNA 1 μ lを鋳型として使用し、Pfu Turbo DNA Polymerase (STRATAGENE社) 2.5 U、プライマー1 (配列番号: 73) およびプライマー2 (配列番号: 74) を各1 μ M、dNTPsを200 μ M、および酵素に2XGC BufferI (TaKaRa社)を25 μ l加え、50 μ lの液量とした。PCR反応は、95 $^{\circ}$ C・1分の後、95 $^{\circ}$ C・1分、60 $^{\circ}$ C・1分、72 $^{\circ}$ C・1.5分のサイクルを38回繰り返し、最後に72 $^{\circ}$ C・5分の伸長反応を行った。次にアガロースゲル電気泳動を行い、Gel

Extraction Kit (QIAGEN社)を用いて該PCR反応産物を精製した。これをZero Blunt TOPO PCR クローニングキット (Invitrogen社)の処方に従いプラスミドベクターpCR-BluntII-TOPO (Invitrogen社)へサブクローニングした。これを大腸菌TOP10に導入し、cDNAを持つクローンをカナマイシンを含むLB寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするcDNAの塩基配列 (配列番号: 72) を得た。このDNAの塩基配列 (配列番号: 72) がコードするアミノ酸配列 (配

132

列番号：71) を含有する新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をマウスTGR23-Aと命名した。

配列番号：72で表される塩基配列を有するDNA断片を有するプラスミドをpTB2237と名付け、プラスミドpTB2237を導入された形質転換体を、大腸菌（

5 Escherichia coli) TOP10/pTB2237と命名した。

参考例4

ラット脳由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするcDNAのクローニングと塩基配列の決定

- 10 ラットMarathon Ready cDNA (CLONTECH社) を鋳型とし、2個のプライマー、プライマー1 (配列番号：79) およびプライマー2 (配列番号：80) を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記cDNA 2.5 μ lを鋳型として使用し、Advantage2 Polymerase Mix (CLONTECH社) 1 μ l、プライマー1 (配列番号：79) およびプライマー2 (配列番号：80) を各0.2
- 15 μ M、dNTPsを800 μ M、および酵素にDMSOを2 μ l加え、50 μ lの液量とした。PCR反応は、95℃・1分の後、95℃・30秒、72℃・4分のサイクルを5回、95℃・30秒、70℃・4分のサイクルを5回、95℃・30秒、68℃・4分のサイクルを30回繰り返し、最後に68℃・3分の伸長反応を行った。次にアガロースゲル電気泳動を行い、GENECLEAN SPIN Kit (
- 20 BIO101社) を用いて該PCR反応産物を精製した。これを TOPO TA クローニングキット (Invitrogen社) の処方に従いプラスミドベクターpCR2.1-TOPO (Invitrogen社) ヘサブクローニングした。これを大腸菌DH5 α に導入し、cDNAを持つクローンをアンピシリンを含むLB寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質を
- 25 コードするcDNAの塩基配列 (配列番号：78) を得た。このDNAの塩基配列 (配列番号：78) がコードするアミノ酸配列 (配列番号：77) を含有する新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をラットTGR23-Iと命名した。

配列番号：78で表される塩基配列を有するDNA断片を有するプラスミドをpCR2.1-rTGR23-Iと名付け、プラスミドpCR2.1-rTGR23が導入された形質転換体を

、大腸菌 (*Escherichia coli*) DH5 α /pCR2.1-rTGR23-1と命名した。

実施例 1

TGR23-2発現 (以下、ヒトTGR23-2を、単にTGR23-2と称することもある) CHO細胞

5 細胞の作成

参考例 1 で得られたプラスミドpTB2174を鋳型とし、Sal I 認識配列を付加したプライマー 1 (配列番号: 7) およびSpe I 認識配列を付加したプライマー 2 (配列番号: 8) を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記プラスミド10 ngを鋳型として使用し、Pfu Turbo DNA Polymerase (ストラタジーン社) 2.5 U、プライマー 1 (配列番号: 7) およびプライマー 2 (配列番号: 8) を各1.0 μ M、dNTPsを200 μ M、および反応液に2 X GC Buffer I (宝酒造) を25 μ l 加え、50 μ l の液量とした。PCR反応は、95 $^{\circ}$ C・60秒の後、95 $^{\circ}$ C・60秒、55 $^{\circ}$ C・60秒、72 $^{\circ}$ C・70秒のサイクルを25回繰り返し、最後に72 $^{\circ}$ C・10分の伸長反応を行った。該PCR反応産物をZero Blunt TOPO PCRクローニングキット (インビトロジェン社) の処方に従いプラスミドベクターpCR-Blunt II-TOPO (インビトロジェン社) ヘサブクローニングした。これを*E. coli* TOP10 (インビトロジェン社) に導入し、pTB2174に含まれるTGR23-2のcDNAを持つクローンをカナマイシンを含むLB寒天培地中で選択した。ここで得られた、5' 側および3' 側にSal IおよびSpe Iがそれぞれ認識する配列を付加したTGR23-2が導入されたプラスミドによって形質転換された*E. coli*のクローンよりPlasmid Miniprep Kit (バイオラッド社) を用いてプラスミドを調製し、制限酵素Sal I およびSpe Iで切断してインサート部分を切り出した。インサートDNAは電気泳動後、アガロースゲルより切り出し、次にGel Extraction Kit (QIAGEN社) を用いて回収した。このインサートDNAをSal I およびSpe Iで切断した動物細胞発現用ベクタープラスミドpAKK0-111H (Hinuma, S. et al. Biochim. Biophys. Acta, Vol. 1219, pp. 251-259 (1994) 記載のpAKK01.11Hと同一のベクタープラスミド) に加え、DNA Ligation Kit Ver. 2 (宝酒造) を用いてライゲーションを行ない、蛋白発現用プラスミドpAKK0-TGR23-2を構築した。このpAKK0-TGR23-2で形質転換した*E. coli* TOP10を培養後、Plasmid Miniprep Kit (バイオラッド社) を用

134

- いてpAKK0-TGR23-2のプラスミドDNAを調製した。ハムスターCHO/dhfr⁻細胞を10%ウシ胎児血清を含む α -MEM培地 (with ribonucleosides and deoxyribonucleosides, GIBCO, Cat. No. 12571) でファルコンディッシュ (径 3.5 cm) に 1×10^5 個播種し、5% CO₂ インキュベーターで37℃一晩培養した。上
- 5 記発現プラスミドpAKK0-TGR23-2 DNA 2 μ gをTransfection Reagent FuGENE 6 (Roche社)を用い、添付説明書記載の方法に従ってトランスフェクトし、18時間培養後新鮮な増殖培地に交換した。さらに10時間培養を続けたのち、トランスフェクトした細胞をトリプシン-EDTA処理により集め、選択培地 (10% 透析牛胎児血清を含む α -MEM培地 (without ribonucleosides and
- 10 deoxyribonucleosides, GIBCO, Cat. No. 12561)) を用いて平底96穴プレート10枚に播種した。3-4日ごとに選択培地を交換しながら培養を続け、2-3週間後にコロニー状に増殖してきたDHFR⁺細胞クローンを79個取得した。

実施例 2

- 15 TaqMan PCR法を用いたTGR23-2発現CHO細胞株のTGR23-2発現量の定量
- 実施例1で得たTGR23-2発現CHO細胞株79クローンを、96ウェルプレートに培養し、RNeasy 96 Kit (QIAGEN社)を用いてtotal RNAを調製した。得られたtotal RNA 50~200 ngを TaqMan Gold RT-PCR Kit (PEバイオシステムズ社)を用いて、逆転写反応を行なった。得られたtotal RNA 5~20 ng相当の逆転写産物、
- 20 または後に述べるようにして作製した標準cDNA、1xUniversal PCR Master Mix (PEバイオシステムズ社)、配列番号: 9で表されるプライマーおよび配列番号: 10で表されるプライマー各500 nM、および配列番号: 11 (Fam-acctggtttg ccgagtgggtc cgctatttt-Tamra; 配列中、Famは6-carboxy-fluoresceinを、Tamraは6-carboxy-tetramethyl-rhodamine をそれぞれ示す)で表されるTaqManプローブ
- 25 100 nMを含む反応混合液25 μ lについてABI PRISM 7700 Sequence Detector (PEバイオシステムズ社)を用いてPCRを行なった。PCRは、50℃・2分、95℃・10分で処理後、95℃・15秒、60℃・60秒のサイクルを40回繰り返すことにより行なった。

標準cDNAは、参考例で得られたプラスミドpTB2174の260nmの吸光度を測定

して濃度を算出し、正確なコピー数を算出した後、1mM EDTAを含む10mM Tris-HCl (pH8.0) 溶液で希釈し、2コピーから 2×10^6 コピーの標準cDNA溶液を調製した。また、TaqMan PCR用プローブおよびプライマーはPrimer Express (Version1.0) (PEバイオシステムズ社) により設計した。

- 5 発現量はABI PRISM 7700 SDSソフトウェアによって算出した。リポーターの蛍光強度が設定された値に達した瞬間のサイクル数を縦軸にとり、標準cDNAの初期濃度の対数値を横軸にとり、標準曲線を作成した。標準曲線より各逆転写産物の初期濃度を算出し、各クローンのtotal RNA当たりのTGR23-2遺伝子発現量を求めた。その結果、TGR23-2の発現が高かったCHO細胞株21個を選択し24ウェルプレートに培養した。これらの細胞について、TGR23-2の発現量を再検した。
- 10 RNeasy Mini Kits (QIAGEN社) を用いてtotal RNAを調製した後、RNase-free DNase Set (QIAGEN社) を用いてDNase処理をした。得られたtotal RNAから、上記と同様に逆転写反応し、TaqMan PCR法で各クローンのtotal RNA当たりのTGR23-2遺伝子発現量を求めた。その結果、TGR23-2発現CHO細胞株クローン
- 15 53と58が高い発現量を示すことがわかった。

以後の実施例では、これら2つのクローンの発現細胞を用いた。

実施例 3

TGR23-2発現CHO細胞を用いた細胞内cAMP産生促進/抑制活性の測定

- 20 実施例1で作製し、実施例2で選択したCHO/TGR23-2細胞を24穴プレートに 7×10^4 cells/wellで播種し、48時間培養した。細胞を0.2 mM 3-イソブチルメチルキサンチンと0.05% BSAと20 mM HEPESを含む α MEM培地 (pH 7.5) で洗浄した (以下、0.2 mM 3-イソブチルメチルキサンチンと0.05% BSAと20 mM HEPESを含む α MEM培地 (pH 7.5) を反応用バッファーと記す)。その後0.5 mlの反応用バッ
- 25 ファーを加えて30分間培養器で保温した。反応用バッファーを除き、新たに0.25 mlの反応用バッファーを細胞に加えた後、試料と2 μ Mフォルスコリンを含む0.25 mlの反応用バッファーを細胞に加え、37℃で30分間反応させた。反応液を除き、cAMP EIAキット (アプライドバイオシステム) 付属の細胞溶解液を0.5 ml添加して細胞内のcAMPを抽出した。抽出液中のcAMP量は、同キットを用いて定量した。

この測定値をもとにして、産生促進/抑制活性を以下に示した式で計算し、% of controlで表した。試料添加群の活性はそれぞれのプレート毎に設置した対照の値を用いて算出した。

$$\% \text{ of control} = (X-C) / (T-C) \times 100$$

5 X : 試料添加群のcAMP量

T : 正対照 (試料無添加、フォルスコリン刺激あり) の3 wellのcAMP量の平均値

C : 負対照 (試料無添加、フォルスコリン刺激なし) の2 wellのcAMP量の平均値

10

実施例 4

TGR23-2発現CHO細胞を用いたアラキドン酸代謝産物遊離促進活性の測定

実施例 1 で作製し、実施例 2 で選択したCHO/TGR23-2細胞を24穴プレートに5 x 10⁴ cells/wellで播種し、24時間培養した。培地を除去し、0.5 μ Ci/ml [³H]-アラキドン酸と10% 透析FBSと20 mM HEPESと0.5% BSAを添加した α MEM培地 (pH 7.4) を500 μ l/well添加し、培養器で16時間保温した。[³H]-アラキドン酸を含む培養液を除き、20 mM HEPESと0.5% BSAを添加した α MEM培地 (pH 7.4) を500 μ l/well添加し、培養器で4時間保温した。培養液を除き、0.05% BSAと20 mM HEPES を添加したハンクス氏液 (pH 7.4) を用い、750 μ l/wellで2回洗浄した (以下、0.05% BSAと20 mM HEPES を添加したハンクス氏液 (pH 7.4) を反応用バッファと記す)。洗浄後、750 μ l/wellの反応用バッファを細胞に加え、培養器で40分間保温した。反応用バッファを除き、新たに250 μ lの反応用バッファを添加した後、試料と250 μ lの反応用バッファを細胞に加え、37℃で40分間反応させた。反応後、上清350 μ lを分取し、液体シンチレーターを3 ml加えて放射活性を測定した。この測定値をもとにしてアラキドン酸代謝産物遊離促進活性を以下に示した式で計算し、% of controlで表した。試料添加群の活性はそれぞれのプレート毎に設置した対照の値を用いて算出した。

$$\% \text{ of control} = (X/C) \times 100$$

X : 試料添加群の放射活性

C : 対照 (試料無添加) の4 wellの放射活性の平均値

実施例 5

TGR23-2発現CHO細胞を用いた細胞内Ca²⁺放出促進活性の測定

- 5 細胞内Ca²⁺放出促進活性はFLIPR (モレキュラーデバイス社) を用いて測定した。実施例 1 で作製し、実施例 2 で選択したCHO/TGR23-2細胞を96穴プレートに3 x 10⁴ cells/wellで播種し、24時間培養した。2.5 mMプロベネシドと20 mM HEPESを含むハンクス氏液 (pH 7.4) (以下、2.5 mMプロベネシドと20 mM HEPESを含むハンクス氏液 (pH 7.4) を洗浄用バッファーと記す) 10 mlにFluo 3-AM 1 バイアル分を添加し、ローディングバッファーを作成した。培養プレートの培養液を除き、ローディングバッファーを100 μ l/well添加して培養器で60分間保温した。培養プレートのローディングバッファーを除き、洗浄用バッファーで洗浄してから、FLIPRの所定の位置に設置した。試料は凍結乾燥品にサンプルバッファー (洗浄用バッファーにBSAを2 mg/ml、CHAPSを1 mg/ml添加したもの) を添加し、
- 10
- 15 攪拌後、超音波処理を30分間行なってから96穴サンプルプレートに移し替えた。このサンプルプレートも設置し、測定を行なった。細胞内Ca²⁺放出促進活性は、試料添加によって惹起された蛍光強度の増加として計測した。

実施例 6

- 20 TGR23-2発現CHO細胞に対して特異的にcAMP産生促進活性を示す活性物質のラット全脳抽出物からの精製

TGR23-2に特異的なリガンド活性を示す物質を、TGR23-2発現CHO細胞に対するcAMP産生促進活性を指標として、ラット全脳から精製した。

- ラット全脳抽出物の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) フラクシオンを以下
- 25 に述べる方法で調製した。日本チャールズリバー (株) より購入したオス8週齢のウィスターラットの全脳400 g (200頭分) を順次摘出直後、25頭ずつ沸騰した蒸留水 (300 ml) に投じて10分間煮沸した。煮沸後、直ちに氷冷し、200頭分を合わせて (2.4 L) 酢酸 180 mlを加えて終濃度1.0 Mとし、低温下ポリトロン (10,000 rpm、2分間) を用いて破碎した。破碎液を遠心 (8,000 rpm、30分) して

上清を取り、沈殿には1.0 M酢酸2.4 Lを加えて再度ポリトロンによって破碎し、一晚攪拌した後、遠心(8,000 rpm、30分)して上清を得た。各遠心で得られた上清は、2倍量(4.8 L)の冷アセトンを4℃でゆっくり滴下した後、1回目の遠心により得られた上清については一晚攪拌し、2回目の遠心により得られた上清については4時間攪拌した。アセトンを加えた抽出液は遠心(8,000 rpm、30分)して沈殿を除き、得られた上清については減圧下エバポレーターにてアセトンを留去した。アセトンを留去した抽出液に等量のジエチルエーテルを加え、分液ロートを使って脂質を含むエーテル層を分離して水層を回収した。エーテル脱脂した抽出液はエバポレーターにて減圧下濃縮しエーテルを完全に除去した。濃縮液をガラス繊維濾紙(アドバンテック、DP70 (90 mmφ))で濾過し、濾液をガラス製カラム(30φ x 240 mm)に充填したODSカラム(ダイソー、Daisogel IR-120-ODS-A 63/210 μm)に付した。カラムを1.0 M酢酸 400 mlで洗浄後、0.1%トリフルオロ酢酸を含む60%アセトニトリル500 mlで溶出した。溶出液を減圧下濃縮して溶媒を留去した後、濃縮液を凍結乾燥した。得られた白色粉末1.2 gを30 mlの0.1%トリフルオロ酢酸を含む10%アセトニトリルに溶解し、12.5 mlずつをODSカラム(東ソー、TSKgel ODS-80Ts (21.5φ x 300 mm))を用いた10%から60%の0.1%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルの濃度勾配溶出法による分取HPLCに付した。HPLCは2回に分けて行い、溶出液は2分毎に60分画にし、2回分の溶出液をまとめた。各分画を減圧下に濃縮・乾固し、残渣に0.4 mlのジメチルスルホキシド(DMSO)を添加後ボルテックスミキサー、および超音波洗浄機を用いて完全に溶解した。

上記によって得られたHPLCフラクションのDMSO溶液を実施例3に示した方法に従いTGR23-2発現CHO細胞に投与し、細胞内cAMP産生量の測定を行なった結果、分画番号18、20および22~23に顕著なcAMP産生促進活性が認められた。また同様の試料について実施例4に示した方法に従いアラキドン酸代謝物遊離活性を調べた結果、顕著な活性が確認された。

これらの活性は他のレセプター発現細胞では認められなかったことより、ラット全脳抽出物にTGR23-2に特異的なリガンド活性物質が存在することが示された。得られた3つの活性画分をそれぞれ以下の(a)~(c)の方法によりさらに精

製した。また、いずれの活性分画についても、以下に述べる最初の陽イオン交換カラムを用いた精製工程において得られたcAMP産生促進活性が認められた分画には、同時に実施例5に記載したFLIPRによってレセプター特異的な細胞内カルシウム遊離活性が認められた。そこで、それ以降の精製工程における活性の確認には、FLIPRによる細胞内カルシウム遊離活性を指標として用い、活性を示した分画がcAMP産生促進活性を示すことについては適宜確認した。

(a) 分画番号18

分画番号18については、10%アセトニトリルを含む10 mMギ酸アンモニウム10 mlに溶解し、陽イオン交換カラム（東ソー、TSKgel SP-5PW (20 mmφ x 150 mm)）に付した後、10%アセトニトリルを含む10 mMから1.0 Mのギ酸アンモニウムの濃度勾配により溶出した。活性はギ酸アンモニウム0.4 M付近に回収された。活性分画を凍結乾燥後、0.1%トリフルオロ酢酸を含む10%アセトニトリル0.8 mlに溶解し、ODSカラム（東ソー、TSKgel ODS-80Ts (4.6 φ x 250 mm)）に付した後、0.1%トリフルオロ酢酸を含む10%から25%のアセトニトリルの濃度勾配により溶出した結果、アセトニトリル13%付近に活性が認められた。得られた活性分画を凍結乾燥後、0.1 mlのDMSOで溶解し、さらに0.7 mlの0.1%ヘプタフルオロ酪酸を含む10%アセトニトリルを加えてODSカラム（和光純薬、Wakosil-II 3C18HG (2.0 mmφ x 150 mm)）に付した後、0.1%ヘプタフルオロ酪酸を含む10%から37.5%のアセトニトリルの濃度勾配により溶出し、ピーク毎に手動で分取した。活性はアセトニトリル26%付近に認められた。活性画分には、さらに0.7 mlの0.1%を含むトリフルオロ酢酸10%アセトニトリルを加え、ODSカラム（和光純薬、Wakosil-II 3C18HG）に付した後、0.1%トリフルオロ酢酸を含む10%から20%のアセトニトリルの濃度勾配によって溶出し、溶出液はピーク毎に手動で分取した。活性はアセトニトリル11%付近に単一ピークとして得られた（図7）。この分画に含まれる活性物質は、以下の実施例10に示すようにして構造決定した。

(b) 分画番号20

分画番号20については、10%アセトニトリルを含む10 mMギ酸アンモニウム10 mlに溶解し、陽イオン交換カラム（東ソー、TSKgel SP-5PW (20 mmφ x 150 mm)）

140

）に付した後、10%アセトニトリルを含む10 mMから1.0 Mのギ酸アンモニウムの濃度勾配により溶出した。活性はギ酸アンモニウム0.6 M付近に回収された。活性分画を凍結乾燥後、0.1%トリフルオロ酢酸を含む10%アセトニトリル0.8 mlに溶解し、CNカラム（野村化学、Develosil CN-UG-5 (4.6 mmφ x 250 mm)）に付した後、0.1%トリフルオロ酢酸を含む10%から25%のアセトニトリルの濃度勾配によって溶出した結果、アセトニトリル12%付近に活性が認められた。得られた活性分画を凍結乾燥後、0.1 mlのDMSOで溶解し、さらに0.7 mlの0.1%トリフルオロ酢酸を含む10%アセトニトリルを加えてODSカラム（和光純薬、Wakosil-II 3C18HG (2.0 mmφ x 150 mm)）に付した後、0.1%トリフルオロ酢酸を含む10%から20%のアセトニトリルの濃度勾配により溶出し、溶出液はピーク毎に手動で分取した。活性はアセトニトリル15%付近に単一ピークとして得られた（図5）。この分画に含まれる活性物質を以下の実施例8に示すようにして構造決定した。

(c) 分画番号22～23

15 分画番号22～23については、10%アセトニトリルを含む10 mMギ酸アンモニウム10 mlに溶解し、陽イオン交換カラム（東ソー、TSKgel SP-5PW (20 mmφ x 150 mm)）に付した後、10%アセトニトリルを含む10 mMから1.0 Mのギ酸アンモニウムの濃度勾配により溶出した。活性はギ酸アンモニウム0.4 M付近に回収された。活性分画を凍結乾燥後、0.1%トリフルオロ酢酸を含む10%アセトニトリル0.8 mlに溶解し、CNカラム（野村化学、Develosil CN-UG-5 (4.6 mmφ x 250 mm)）に付した後、0.1%トリフルオロ酢酸を含む10%から25%のアセトニトリルの濃度勾配によって溶出した結果、アセトニトリル13%付近に活性が認められた。得られた活性分画を凍結乾燥後、0.1 mlのDMSOで溶解し、さらに0.7 mlの0.1%トリフルオロ酢酸を含む10%アセトニトリルを加えてODSカラム（和光純薬、Wakosil-II 3C18HG (2.0 mmφ x 150 mm)）に付した後、0.1%トリフルオロ酢酸を含む10%から20%のアセトニトリルの濃度勾配により溶出し、ピーク毎に手動で分取した。活性はアセトニトリル16%付近に認められた。活性分画には、さらに0.7 mlの0.1%ヘプタフルオロ酢酸を含む10%アセトニトリルを加え、ODSカラム（和光純薬、Wakosil-II 3C18HG）に付した後、0.1%ヘプタフルオロ酢酸を含

141

む10%から37.5%のアセトニトリルの濃度勾配によって溶出し、溶出液はピーク毎に手動で分取した。活性はアセトニトリル28%付近に単一ピークとして得られた(図6)。この分画に含まれる活性物質は、以下の実施例9に示すようにして構造決定した。

5

実施例7

ラット全脳抽出物中のTGR23-2発現CHO細胞に対して特異的に細胞内cAMP産生促進活性を示す活性物質のプロナーゼによる失活

10 実施例6でTGR23-2発現CHO細胞に対して細胞内cAMP産生促進活性を示したHPLC分画18、20および22~23を、タンパク質分解酵素であるプロナーゼ(Sigma, protease Type XIV (P5147))で処理し、活性物質が蛋白性であるか否かを調べた。

15 上記ラット全脳抽出物HPLC活性分画(分画番号18、20および22~23)各4 μ lを0.2 M酢酸アンモニウム100 μ lに加え、これにプロナーゼ3 μ gを添加して37℃で2時間インキュベートした後、沸騰水中で10分間加熱して添加したプロナーゼを失活させた。これにBSA 0.05mgおよびCHAPS 0.05 mgを含む蒸留水1mlを加え凍結乾燥した。凍結乾燥した試料を、実施例3に示す方法に従いTGR23-2発現CHO細胞に添加して細胞内cAMP産生促進活性を測定した。

その結果、いずれの分画の活性もプロナーゼ処理によって完全に消失した。

20 従って、ラット全脳抽出物中のTGR23-2発現CHO細胞に対して細胞内cAMP産生促進活性を示す活性物質は、いずれもタンパク質またはペプチドであることが明らかとなった。

実施例8

25 ラット全脳抽出物の分画番号20から得られたTGR23-2発現CHO細胞に対して特異的にcAMP産生促進活性を示す活性物質のアミノ酸配列の決定

実施例7に示したようにラット全脳抽出物の3つの分画に含まれるTGR23-2発現CHO細胞に対して特異的にcAMP産生促進活性を示す活性物質は、いずれもタンパク性であることが予想されたので、以下のようにそれぞれについてアミノ酸配

列解析を行なった。

実施例 6 に示すようにしてラット全脳抽出物の分画番号20から得られたTGR23-2発現CHO細胞に対して特異的にcAMP産生促進活性を示す活性物質のアミノ酸配列解析および質量分析を行なった。活性ピークを含む溶出液を用いてProcise

- 5 491cLCプロテインシーケンサー（アプライドバイオシステム）によるアミノ末端アミノ酸配列分析を行なったところ、N末端から18残基までにSFRNGVGSGVKKTSFRRA（配列番号：12）のアミノ酸配列が得られた。同様の溶出液を用いてナノスプレーイオン源（プロタナ）を装着したThermo Finnigan LCQイオントラップ質量分析計（サーモクエスト）による質量分析を行なった結果、
- 10 配列番号：12のアミノ酸配列から計算される質量値が得られた（実測値：1954.9、計算値：1954.2）。

これより、ラット全脳抽出物の分画番号20から得られたTGR23-2発現CHO細胞に対して特異的にcAMP産生促進活性を示す活性物質は、配列番号：12に示すアミノ酸配列を有するものであると決定された。

15

実施例 9

ラット全脳抽出物の分画番号22～23から得られたTGR23-2発現CHO細胞に対して特異的にcAMP産生促進活性を示す活性物質のアミノ酸配列の決定

- 実施例 6 に示すようにしてラット全脳抽出物の分画番号22～23から得られた
- 20 TGR23-2発現CHO細胞に対して特異的にcAMP産生促進活性を示す活性物質のアミノ酸配列解析および質量分析を行なった。活性ピークを含む溶出液を用いてProcise 491cLCプロテインシーケンサー（アプライドバイオシステム）によるアミノ末端アミノ酸配列分析を行なったところ、N末端から15残基までにSFRNGVGSGVKKTSF（配列番号：13）のアミノ酸配列が得られた。同様の溶出液
- 25 を用いてナノスプレーイオン源（プロタナ）を装着したThermo Finnigan LCQイオントラップ質量分析計（サーモクエスト）による質量分析を行なった結果、配列番号：13のアミノ酸配列から計算される質量値が得られた（実測値：1570.8、計算値：1570.8）。

これより、ラット全脳抽出物の分画番号22～23から得られたTGR23-2発現CHO細

143

胞に対して特異的にcAMP産生促進活性を示す活性物質は、配列番号：13に示すアミノ酸配列を有するものであると決定された。

実施例10

- 5 ラット全脳抽出物の分画番号18から得られたTGR23-2発現CHO細胞に対して特異的にcAMP産生促進活性を示す活性物質のアミノ酸配列の決定

実施例6に示すようにしてラット全脳抽出物の分画番号18から得られたTGR23-2発現CHO細胞に対して特異的にcAMP産生促進活性を示す活性物質のアミノ酸配列解析および質量分析を行なった。活性ピークを含む溶出液を用いてProcise

- 10 491cLCプロテインシーケンサー（アプライドバイオシステム）によるアミノ末端アミノ酸配列分析を行なったところ、N末端から14残基までにSFRNGVGSVKKTS（配列番号：14）のアミノ酸配列が得られた。同様の溶出液を用いてナノスプレーイオン源（プロタナ）を装着したThermo Finnigan LCQイオントラップ質量分析計（サーモクエスト）による質量分析を行なった結果、配列番号：14のアミ
15 ノ酸配列から計算される質量値が得られた（実測値：1424.1、計算値：1423.6）。

これより、ラット全脳抽出物の分画番号18から得られたTGR23-2発現CHO細胞に対して特異的にcAMP産生促進活性を示す活性物質は、配列番号：14に示すアミノ酸配列を有するものであると決定された。

20 実施例11

ヒトTGR23-2リガンド前駆体をコードするcDNAのクローニング

- ラット全脳抽出物から得られたTGR23-2発現CHO細胞に対して特異的にcAMP産生促進活性を示す活性ペプチド（本明細書中、ラットTGR23-2リガンドと記載することがある）のヒトホモログ（本明細書中、ヒトTGR23-2リガンドと記載することがある）の前駆体をコードするcDNAをクローニングするため、ヒト視床下部由来のcDNAを鋳型としたPCRを行なった。
- 25 以下の合成DNAプライマーを用い、ヒト視床下部由来のcDNAを鋳型としてPCR法による増幅を行なった。反応液の組成は、ヒト視床下部Marathon-Ready cDNA（CLONTECH）0.8μl、配列番号：15および配列番号：16の合成DNAプライマー

144

各1.0 μ M、0.2 mM dNTPs、ExTaq（タカラ）0.1 μ lおよび酵素に付属のExTaqバッファで、総反応量は20 μ lとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー（PE Biosystems）を用い、94℃・300秒の加熱の後、94℃・10秒、55℃・30秒、72℃・30秒のサイクルを35回繰り返し、最後に72℃で5分間保温した。次に

5 、DNase、RNase Freeの蒸留水で50倍希釈したPCR反応液2 μ l、配列番号：15 および配列番号：17の合成DNAプライマー各1.0 μ M、0.2 mM dNTPs、ExTaqポリメラーゼ（タカラ）0.1 μ lおよび酵素に付属のExTaqバッファで総反応量を20 μ lとし、サーマルサイクラー（PE Biosystems）を用い、94℃・300秒の加熱の後、94℃・10秒、55℃・30秒、72℃・30秒のサイクルを35回繰り返し、最後に72

10 ℃で5分間保温した。増幅したDNAを2.0%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、バンドの部分をカミソリで切り出し、DNAをQIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いて回収した。このDNAを、pGEM-T Easy Vector System（プロメガ）のプロトコールに従ってpGEM-T Easyベクターへ、クローニングした。これを大腸菌（*Escherichia coli*）JM109 competent cell（タカラ）に導入して形質転

15 換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。この形質転換体を*Escherichia coli* JM109/pGEM-T Easy Human TGR23 (2) Ligand Precursorと命名した。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit（QIAGEN）を用いてプラス

20 ミドDNAを調整した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit（PE Biosystems）を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号：18に示すDNA配列を得た。

配列番号：18で表されるDNAの塩基配列には、配列番号：12、配列番号：13および配列番号：14で表されるラット全脳から得られたラットTGR23-2リガンドのアミノ酸配列に極めて類似したアミノ酸配列をコードするようなフレームが存在したことからヒトTGR23-2リガンドの前駆体あるいはその一部をコードするcDNAであると推定された。

25

ヒトTGR23-2リガンドと考えられるアミノ酸配列をコードするようなフレームで配列番号：18から翻訳されるアミノ酸配列の5'上流側には蛋白翻訳の開始

コドンであると予想されるATGが2ヶ所存在するが、疎水性プロットを行なったところ、より5'上流側のATGから翻訳した場合にのみシグナル配列と推定される疎水性の高い領域が出現したのでこのATGが開始コドンであると推定した。

3'側にはヒトTGR23-2リガンドをコードすると考えられる配列の下流に終止コ
5 ドンが存在した。以上により推定されたヒトTGR23-2リガンド前駆体のアミノ酸配列を配列番号：19に示す。この配列において、ヒトTGR23-2リガンドに相当すると考えられるアミノ酸配列のN末側には、通常生理活性ペプチドがその前駆体から切り出されるとされるLys-Argの配列(Seidah, N. G. et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 839巻、9-24頁、1998年)が存在した。一方、C末側には終止コ
10 ドンが存在したが、配列番号：12で表されるアミノ酸配列を有するラットTGR23-2リガンドに対応する配列との間にさらに2残基が存在した。

これより、ヒトTGR23-2リガンドのアミノ酸配列は、ラット全脳抽出物より得られたラットTGR23-2リガンドのアミノ酸配列；配列番号：12〔ラットTGR23-2リガンド(1-18)〕、配列番号：13〔ラットTGR23-2リガンド(1-15)〕およ
15 び配列番号：14〔ラットTGR23-2リガンド(1-14)〕にそれぞれ対応する、配列番号：20〔ヒトTGR23-2リガンド(1-18)〕、配列番号：21〔ヒトTGR23-2リガンド(1-15)〕および配列番号：22〔ヒトTGR23-2リガンド(1-14)〕で表されるアミノ酸配列、およびさらに配列番号：20のC末側に2残基延長された配列番号：23で表されるアミノ酸配列〔ヒトTGR23-2リガンド(1-20)〕であ
20 ると推定された。さらに、ヒトTGR23-2リガンドの配列は、マウスTGR23-2リガンドおよびラットTGR23-2リガンドの配列と異なり、その配列中にArg-Arg配列ではなくGln-Arg配列を有することから、配列番号：49に示された16残基のアミノ酸配列〔ヒトTGR23-2リガンド(1-16)〕もまたリガンドの配列であると推定された。

25

実施例12

マウスTGR23-2リガンド前駆体をコードするcDNAのクローニング

ラット全脳抽出物から得られたラットTGR23-2リガンドのマウスホモログ(本明細書中、マウスTGR23-2リガンドと記載することがある)の前駆体をコードす

るcDNAをクローニングするため、マウス全脳由来のcDNAを鋳型としたPCRを行なった。

以下の合成DNAプライマーを用い、マウス全脳由来のcDNAを鋳型としてPCR法による増幅を行なった。反応液の組成は、マウス全脳Marathon-Ready cDNA

- 5 (CLONTECH) 0.8 μ l、配列番号：24および配列番号：25の合成DNAプライマー各1.0 μ M、0.2 mM dNTPs、ExTaq（タカラ）0.1 μ lおよび酵素に付属のExTaqバッファーで、総反応量は20 μ lとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー（PE Biosystems）を用い、94℃・5分間の加熱の後、94℃・10秒、65℃・30秒、72℃・30秒のサイクルを35回繰り返し、最後に72℃で5分間保温した。次に
- 10 、DNase、RNase Freeの蒸留水で100倍希釈したPCR反応液2 μ l、配列番号：24および配列番号：26の合成DNAプライマー各1.0 μ M、0.2 mM dNTPs、ExTaqポリメラーゼ（タカラ）0.1 μ lおよび酵素に付属のExTaqバッファーで総反応量を20 μ lとし、サーマルサイクラー（PE Biosystems）を用い、94℃・5分間の加熱の後、94℃・10秒、60℃・30秒、72℃・30秒のサイクルを30回繰り返し、最後に72
- 15 ℃で5分間保温した。増幅したDNAを2.0%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約440塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いて回収した。このDNAを、pGEM-T Easy Vector System（プロメガ）のプロトコールに従ってpGEM-T Easyベクターへ、クローニングした。これを大腸菌（*Escherichia coli*）JM109 competent cell（タカラ）に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含む
- 20 LB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。この形質転換体を*Escherichia coli* JM109/pGEM-T Easy Mouse TGR23 (2) Ligand Precursorと命名した。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit（QIAGEN）を用いてプ
- 25 ラスミドDNAを調整した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit（PE Biosystems）を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号：27で表されるDNA配列を得た。

配列番号：27で表されるDNAの塩基配列には、配列番号：12、配列番号：

1 3 および配列番号：1 4 で表されるラット全脳から得られたラットTGR23-2リガンドのアミノ酸配列に極めて類似したアミノ酸配列をコードするようなフレームが存在したことからマウスTGR23-2リガンドの前駆体あるいはその一部をコードするcDNAであると推定された。

- 5 マウスTGR23-2リガンドと考えられるアミノ酸配列をコードするようなフレームで配列番号：2 7 から翻訳されるアミノ酸配列の5'上流側には蛋白翻訳の開始コドンであると予想されるATGが2ヶ所存在するが、疎水性プロットを行なったところ、より5'上流側のATGから翻訳した場合にのみシグナル配列と推定される疎水性の高い領域が出現したのでこのATGが開始コドンであると推定した。この
- 10 ATGコドンのさらに5'上流側には同じフレームで終止コドンが出現した。3'側にはマウスTGR23-2リガンドをコードすると考えられる配列の下流に終止コドンが存在した。以上により推定されたマウスTGR23-2リガンド前駆体のアミノ酸配列を配列番号：2 8 に示す。この配列において、マウスTGR23-2リガンドに相当すると考えられるアミノ酸配列のN末側には、通常生理活性ペプチドがその前駆体か
- 15 ら切り出されるとされるLys-Argの配列 (Seidah, N. G. et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 839巻、9-24頁、1998年) が存在した。一方、C末側には終止コドンが存在したが、配列番号：1 2 のラットTGR23-2リガンドに対応する配列との間にさらに2残基が存在した。

- これより、マウスTGR23-2リガンドのアミノ酸配列は、ラット全脳抽出物より
- 20 得られたラットTGR23-2リガンドのアミノ酸配列；配列番号：1 2 [ラットTGR23-2リガンド (1-18)]、配列番号：1 3 [ラットTGR23-2リガンド (1-15)] および配列番号：1 4 [ラットTGR23-2リガンド (1-14)] それぞれに対応する、配列番号：2 9 [マウスTGR23-2リガンド (1-18)]、配列番号：3 0 [マウスTGR23-2リガンド (1-15)] および配列番号：3 1 [マウスTGR23-2リガンド
- 25 (1-14)] で表されるアミノ酸配列、およびさらに配列番号：2 9 のC末側に2残基延長された配列番号：3 2 で表されるアミノ酸配列 [マウスTGR23-2リガンド (1-20)] であると推定された。

148

ラットTGR23-2リガンド前駆体の一部をコードするcDNAのクローニング

ラットTGR23-2リガンドの前駆体をコードするcDNAをクローニングするためラット全脳由来のcDNAを鋳型としたPCRを行なった。

以下の合成DNAプライマーを用い、ラット全脳由来のcDNAを鋳型としてPCR法に

- 5 による増幅を行なった。反応液の組成は、ラット全脳Marathon-Ready cDNA (CLONTECH) 0.8 μ l、配列番号：33および配列番号：25の合成DNAプライマー各1.0 μ M、0.2 mM dNTPs、ExTaq (タカラ) 0.1 μ lおよび酵素に付属のExTaqバッファで、総反応量は20 μ lとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、94℃・5分間の加熱の後、94℃・10秒、65℃・30秒、
- 10 72℃・30秒のサイクルを35回繰り返す、最後に72℃で5分間保温した。次に、DNase、RNase Freeの蒸留水で100倍希釈したPCR反応液2 μ l、配列番号：33のプライマー1.0 μ M、配列番号：26の合成DNAプライマー0.2 μ M、0.2 mM dNTPs、ExTaqポリメラーゼ (タカラ) 0.1 μ lおよび酵素に付属のExTaqバッファで総反応量を20 μ lとし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、94℃・5分
- 15 間の加熱の後、94℃・10秒、60℃・30秒、72℃・30秒のサイクルを30回繰り返す、最後に72℃で5分間保温した。増幅したDNAを2.0%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約200塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて回収した。このDNAを、pGEM-T Easy Vector System (プロメガ) のプロトコールに従ってpGEM-T Easyベクターへ、クローニ
- 20 グした。これを大腸菌 (*Escherichia coli*) JM109 competent cell (タカラ) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晩培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドDNAを調
- 25 整した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号：34で表されるDNA配列を得た。

配列番号：34で表されるDNAの塩基配列には、配列番号：12、配列番号：

13および配列番号：14で表されるラット全脳から得られたラットTGR23-2リ

ガンドのアミノ酸配列をコードするフレームが存在した。このフレームを読み取り枠としてDNA配列を翻訳したところ、配列番号：35で表されるアミノ酸配列が得られた。この配列を実施例12で得られたマウスTGR23-2リガンド前駆体のアミノ酸配列（配列番号：27）と比較することにより、本配列がラットTGR23-2リガンド前駆体の一部であるC末側の54アミノ酸からなる配列に相当することが推定された。3'側にはラットTGR23-2リガンドをコードする配列の下流に終止コドンが存在した。この配列において、ラットTGR23-2リガンドのアミノ酸配列のN末側には、通常生理活性ペプチドがその前駆体から切り出されるとされるLys-Argの配列（Seidah, N. G. et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 839巻、9-24頁、1998年）が存在した。一方、C末側には終止コドンが存在したが、配列番号：12のラットTGR23-2リガンドの配列との間にさらに2残基が存在した。

これより、ラットTGR23-2リガンドのアミノ酸配列は、ラット全脳抽出物より得られた配列番号：12〔ラットTGR23-2リガンド（1-18）〕、配列番号：13〔ラットTGR23-2リガンド（1-15）〕および配列番号：14〔ラットTGR23-2リガンド（1-14）〕で表されるアミノ酸配列、およびさらに配列番号：12のC末側に2残基延長された配列番号：36で表されるアミノ酸配列〔ラットTGR23-2リガンド（1-20）〕であると推定された。

実施例14

20 ラットTGR23-2リガンド前駆体をコードするcDNAのクローニング

ラットTGR23-2リガンドの前駆体をコードするcDNAをクローニングするためラット全脳由来のcDNAを鋳型としたPCRを行なった。

以下の合成DNAプライマーを用い、ラット全脳由来のcDNAを鋳型としてPCR法による増幅を行なった。反応液の組成は、ラット全脳Marathon-Ready cDNA (CLONTECH) 0.8 μ l、配列番号：57および配列番号：58の合成DNAプライマー各1.0 μ M、0.2 mM dNTPs、ExTaq（タカラ）0.1 μ lおよび酵素に付属のExTaqバッファーで、総反応量は20 μ lとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー（PE Biosystems）を用い、94℃・5分間の加熱の後、94℃・10秒、65℃・30秒、72℃・30秒のサイクルを35回繰り返し、最後に72℃で5分間保温した。次に、

150

- DNase、RNase Freeの蒸留水で50倍希釈したPCR反応液2 μ l、配列番号：59のプライマー1.0 μ M、配列番号：58の合成DNAプライマー0.2 μ M、0.2 mM dNTPs、ExTaqポリメラーゼ（タカラ）0.1 μ lおよび酵素に付属のExTaqバッファーで総反応量を20 μ lとし、サーマルサイクラー（PE Biosystems）を用い、94℃・5分
- 5 間の加熱の後、94℃・10秒、65℃・30秒、72℃・30秒のサイクルを30回繰り返し、最後に72℃で5分間保温した。増幅したDNAを2.0%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約350塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いて回収した。このDNAを、pGEM-T Easy Vector System（プロメガ）のプロトコルに従ってpGEM-T Easyベクターへクローニング
- 10 した。これを大腸菌（*Escherichia coli*）JM109 competent cell（タカラ）に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。この形質転換体を*Escherichia coli* JM109/pGEM-T Easy Rat TGR23 (2) Ligand Precursorと命名した。個々のクロー
- 15 ンをアンピシリンを含むLB培地で一晩培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit（QIAGEN）を用いてプラスミドDNAを調整した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit（PE Biosystems）を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号：60で表されるDNA配列を得た。
- 20 配列番号：60で表されるcDNAの塩基配列は、実施例13で得たラットTGR23-2リガンド前駆体の一部をコードするDNA配列（配列番号：34）がさらに5'側に延長された配列であった。本配列を、配列番号：12、配列番号：13または配列番号：14で表されるラット全脳から得られたラットTGR23-2リガンドのアミノ酸配列に一致するアミノ酸配列をコードするようなフレームを読み取り枠とし
- 25 て翻訳したところ、5'上流側には、ヒトTGR23-2リガンド前駆体およびマウスTGR23-2リガンド前駆体をコードすると推定されるcDNA（配列番号：18および配列番号：27）に存在する蛋白翻訳の開始コドンであると予想されるATGに対応する位置に、ATGが1ヶ所存在した。また、このATGコドンのさらに5'上流側には同じフレームで終止コドンが出現した。3'側にはマウスTGR23-2リガンドをコ

151

ードすると考えられる配列の下流に終止コドンが存在した。これより、配列番号：60で表される配列は、ラットTGR23-2リガンド前駆体をコードするcDNA配列であると推定された。配列番号：60で表されるcDNAの塩基配列から翻訳されるアミノ酸配列を配列番号：61に示す。

5

実施例 15

TGR23-1（以下、ヒトTGR23-1を、単にTGR23-1と称することもある）発現CHO細胞の作成

- 参考例1で得られたプラスミドpTB2173を鋳型とし、Sal I認識配列を付加した
- 10 プライマー1（配列番号：7）およびSpe I認識配列を付加したプライマー2（配列番号：8）を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記プラスミド10 ngを鋳型として使用し、Pfu Turbo DNA Polymerase（ストラタジーン社）2.5 U、プライマー1（配列番号：7）およびプライマー2（配列番号：8）を各1.0 μ M、dNTPsを200 μ M、および反応液に2 X GC Buffer I（
- 15 宝酒造）を25 μ l加え、50 μ lの液量とした。PCR反応は、95℃・60秒の後、95℃・60秒、55℃・60秒、72℃・70秒のサイクルを25回繰り返し、最後に72℃・10分の伸長反応を行った。該PCR反応産物をZero Blunt TOPO PCRクローニングキット（インビトロジェン社）の処方に従いプラスミドベクターpCR-BluntII-TOPO（インビトロジェン社）へサブクローニングした。これをE. coli TOP10（インビ
- 20 トロジェン社）に導入し、pTB2173に含まれるTGR23-1のcDNAを持つクローンを、カナマイシンを含むLB寒天培地中で選択した。ここで得られた、5'側および3'側にSal IおよびSpe Iがそれぞれ認識する配列を付加したTGR23-1が導入されたプラスミドによって形質転換されたE. coliのクローンよりPlasmid Miniprep Kit（バイオラッド社）を用いてプラスミドを調製し、制限酵素Sal I およびSpe
- 25 Iで切断してインサート部分を切り出した。インサートDNAは電気泳動後、アガロースゲルより切り出し、次にGel Extraction Kit（QIAGEN社）を用いて回収した。このインサートDNAをSal I およびSpe Iで切断した動物細胞発現用ベクタープラスミドpAKK0-111H（Hinuma, S. et al. Biochim. Biophys. Acta, Vol. 1219, pp. 251-259 (1994) 記載のpAKK01. 11Hと同一のベクタープラスミド）に加え、

152

DNA Ligation Kit Ver. 2 (宝酒造) を用いてライゲーションを行ない、蛋白発現用プラスミドpAKKO-TGR23-1を構築した。このpAKKO-TGR23-1で形質転換したE. coli TOP10を培養後、Plasmid Miniprep Kit (バイオラッド社) を用いてpAKKO-TGR23-1のプラスミドDNAを調製した。

- 5 ハムスターCHO/dhfr⁻細胞を10%ウシ胎児血清を含む α -MEM培地 (with ribonucleosides and deoxyribonucleosides, GIBCO, Cat. No. 12571) でファルコンディッシュ (径3.5 cm) に 1×10^5 個播種し、5% CO₂インキュベーターで37℃一晩培養した。上記発現プラスミドpAKKO-TGR23-1 DNA 2 μ gをTransfection Reagent FuGENE 6 (Roche社) を用い、添付説明書記載の方法に従ってトランスフェクトし、18時間培養後、新鮮な増殖培地に交換した。さらに10時間培養を続けたのち、トランスフェクトした細胞をトリプシン-EDTA処理により集め、選択培地 (10% 透析牛胎児血清を含む α -MEM培地 (without ribonucleosides and deoxyribonucleosides, GIBCO, Cat. No. 12561)) を用いて平底96穴プレート10枚に播種した。3-4日ごとに選択培地を交換しながら培養を続け、2-3週間後にコロニー状に増殖してきたDHFR⁺ 細胞クローンを81個取得した。
- 10
- 15

実施例 1 6

TaqMan PCR法を用いたTGR23-1発現CHO細胞株のTGR23-1発現量の定量

- 実施例 1 5 で得たTGR23-1発現CHO細胞株81クローンを、96ウェルプレートに培養し、RNeasy 96 Kit (QIAGEN社) を用いてtotal RNAを調製した。得られたtotal RNA 50~200 ngを TaqMan Gold RT-PCR Kit (P Eバイオシステムズ社) を用いて、逆転写反応を行なった。得られたtotal RNA 5~20 ng相当の逆転写産物、または後に述べるようにして作製した標準cDNA、1xUniversal PCR Master Mix (P Eバイオシステムズ社)、配列番号：9で表されるプライマーおよび配列番号：10で表されるプライマー各500 nM、および配列番号：11 (Fam-acctggtttg ccgagtggtc cgctattt-Tamra; 配列中、Famは6-carboxy-fluoresceinを、Tamraは6-carboxy-tetramethyl-rhodamine をそれぞれ示す) で表されるTaqManプローブ 100 nMを含む反応混合液25 μ lについてABI PRISM 7700 Sequence Detector (P Eバイオシステムズ社) を用いてPCRを行なった。P
- 20
- 25

CRは、50℃・2分、95℃・10分で処理後、95℃・15秒、60℃・60秒のサイクルを40回繰り返すことにより行なった。

標準cDNAは、参考例1で得られたプラスミドpTB2174の260nmの吸光度を測定して濃度を算出し、正確なコピー数を算出した後、1mM EDTAを含む10mM Tris-HCl (pH8.0) 溶液で希釈し、2コピーから 2×10^6 コピーの標準cDNA溶液を調製した。また、TaqMan PCR用プローブおよびプライマーはPrimer Express (Version1.0) (PEバイオシステムズ社) により設計した。

発現量はABI PRISM 7700 SDSソフトウェアによって算出した。リポーターの蛍光強度が設定された値に達した瞬間のサイクル数を縦軸にとり、標準cDNAの初期濃度の対数値を横軸にとり、標準曲線を作成した。標準曲線より各逆転写産物の初期濃度を算出し、各クローンのtotal RNA当たりのTGR23-1遺伝子発現量を求めた。その結果、TGR23-1の発現が高かったCHO細胞株11個を選択し24ウェルプレートに培養した。これらの細胞について、TGR23-1の発現量を再検した。RNeasy Mini Kits (QIAGEN社) を用いてtotal RNAを調製した後、RNase-free DNase Set (QIAGEN社) を用いてDNase処理をした。得られたtotal RNAから、上記と同様に逆転写反応し、TaqMan PCR法で各クローンのtotal RNA当たりのTGR23-1遺伝子発現量を求めた。その結果、TGR23-1発現CHO細胞株クローン49および52が高い発現量を示すことがわかった。

以後の実施例では、これら2つのクローンの発現細胞を用いた。

20

実施例17

ヒトTGR23-2リガンド (1-20) : Ser-Phe-Arg-Asn-Gly-Val-Gly-Thr-Gly-Met-Lys-Lys-Thr-Ser-Phe-Gln-Arg-Ala-Lys-Ser (配列番号: 23) の製造

市販のBoc-Ser (Bzl) -OCH₂-PAM樹脂を、ペプチド合成機ACT90の反応槽に入れ、DCMで膨潤後TFAでBocを除去し、DIEAで中和した。この樹脂をNMPに懸濁し、HOBt-DIPCIでBoc-Lys (Cl-Z) を縮合した。反応後ニンヒドリンテストで遊離のアミノ基の有無を調べ、ニンヒドリンテストがプラスの時には同じアミノ酸を再度縮合した。再縮合後においてもニンヒドリンテストがプラスの時には無水酢酸でアセチル化した。このサイクルを繰り返しBoc-Ala、Boc-

154

Arg (Tos)、Boc-Gln、Boc-Phe、Boc-Ser (Bzl)、Boc-Thr (Bzl)、Boc-Lys (Cl-Z)、
Boc-Lys (CL-Z)、Boc-Met、Boc-Gly、Boc-Thr (Bzl)、Boc-Gly、Boc-Val、Boc-
Gly、Boc-Asn、Boc-Arg (Tos)、Boc-Phe、Boc-Ser (Bzl) を配列順に縮合し、所望
の保護ペプチド樹脂0.24 gを得た。この樹脂をp-クレゾール1.5 mlとともにフッ
5 化水素約15 ml中、0℃で60分攪拌した後フッ化水素を減圧留去し、残留物にジエ
チルエーテルを加えて濾過した。濾過物に水と酢酸を加えペプチドを抽出し、樹
脂と分離した。抽出液を濃縮し50%酢酸で充填したセファデックス（商標）G-25
カラム（2.0 x 80 cm）に付し、同溶媒で展開、主要画分を集め凍結乾燥した。
その一部（45 mg）をLiChroprep（商標）RP-18を充填した逆相クロマトカラム（
10 2.6 x 60 cm）に付け、0.1% TFA水 200mlで洗浄、0.1% TFA 水 300mlと0.1% TFA
含有 25% アセトニトリル水 300mlを用いた線型勾配溶出を行い、主要画分を集
め凍結乾燥し目的とするペプチド12.7 mgを得た。

ESI-MS：分子量MW 2188.0 (理論値 2187.5)

HPLC溶出時間 10.6分

15 カラム条件：

カラム：Wakosil 5C18T 4.6 x 100mm

溶離液：A液－0.1% TFA水、B液－0.1%TFA含有アセトニトリルを用い A/B：
95/5～45/55へ直線型濃度勾配溶出（25分）

流速：1.0 ml / 分

20

実施例 18

FLIPRを用いたヒトTGR23-2リガンド（1-20）によるTGR23-1発現CHO細胞および
TGR23-2発現CHO細胞の細胞内Caイオン濃度上昇活性の測定

実施例 17 で得られたヒトTGR23-2リガンド（1-20）を種々の濃度で、実施例
25 5 に記載した方法に従って、TGR23-1発現CHO細胞およびTGR23-2発現CHO細胞に投
与し、細胞内Caイオン濃度上昇活性をFLIPRを用いて測定したところ、ヒト
TGR23-2リガンド（1-20）は、濃度依存的にTGR23-1発現CHO細胞およびTGR23-2発
現CHO細胞の細胞内Caイオン濃度上昇を促進した。結果を図8および図9に示す

。

155

これより、配列番号：23で表されるアミノ配列を有するポリペプチド〔ヒトTGR23-2リガンド(1-20)〕が、TGR23-1およびTGR23-2に対する細胞内Caイオン濃度上昇活性を有することが明らかである。

5 実施例19

ラットTGR23-2リガンド(1-18)：Ser-Phe-Arg-Asn-Gly-Val-Gly-Ser-Gly-Val-Lys-Lys-Thr-Ser-Phe-Arg-Arg-Ala(配列番号：12)の製造

市販の2-chlorotrityl resin (Clt resin、1.33 mmol/g)にFmoc-Ala-OHを導入したFmoc-Ala-O-Clt resin (0.638 mmol/g) 0.25 mmol分をペプチド合成機ABI 433Aの反応槽に入れ、Fmoc/DCC/HOBt法を用い、固相合成を行なった。Fmocアミノ酸の側鎖保護基はArgにはPbf基、SerにはBu^t基、LysにはBoc基、AsnにはTrt基を用いた。他のアミノ酸は側鎖無保護のものをを用い、上記に示す配列の17位ArgからN末端方向へ順に14位Serまでペプチド鎖を導入した。得られたFmoc-ラットTGR23-2リガンド(14-18)-O-Clt resin (0.25 mmol)をFmoc-Lys(Boc)-Thr(Psi(Me, Me)pro)-OH (NOVA社製、製品番号05-20-1116) 381.1 mg (0.625 mmol)、PyAOP 326.1 mg (0.625 mmol)、HOAt 85.1 mg (0.625 mmol)、DIEA 435.5 ml (2.5 mmol)で処理することで12位Lys、13位Thrを導入した。続いて得られたFmoc-Lys(Boc)-Thr(Psi(Me, Me)pro)^{13]}-ラットTGR23-2リガンド(12-18)-O-Clt resinを用いてペプチド合成機による固相合成を再開、11位LysからN末端方向へ順に1位Serまでペプチド鎖を導入し、目的の保護ペプチド樹脂573.5 mgを得た。

この樹脂の全て(0.25 mmol)をTFA、thioanisole、m-cresol、水、triisopropylsilane、ethanedithiol (80:5:5:5:2.5:2.5)の混合液9 ml中で室温、90分間攪拌した後、反応溶液にエーテルを加え、白色粉末を析出させ遠心分離後、上清を除く操作を3回繰り返した。残渣を水で抽出後、凍結乾燥し白色粉末を219.4 mg得た。得られた粗ペプチドをYMC Pack R&D-ODS-5-B S-5、120Aカラム(30 x 250 mm)を用いた分取HPLCで、A液：0.1% TFA-水、B液：0.1% TFA含有アセトニトリルによるA/B：90/10~70/30への直線型濃度勾配溶出(60分)を行ない、目的物を含む分画を集め凍結乾燥し白色粉末を得た。

156

得られた粉末を全て水に溶解、混合したあと、溶液にBIO-RAD社製イオン交換樹脂AG1 x 8 100-200 mesh chloride formを酢酸塩化した樹脂を3 ml分加え、20分攪拌後濾過により樹脂と不純物を除いた後、凍結乾燥して酢酸塩として白色粉末107.0 mgを得た。

5 ESI-MS : M^+ 1954.2 (理論値 1954.2)

HPLC溶出時間 : 15.2分

溶出条件

カラム : YMC AM 301 (4.6 x 100mm)

溶離液 : A液 : 0.1% TFA-水、B液 : 0.1% TFA含有アセトニトリルを用い、A/B :

10 100/0~50/50へ直線型濃度勾配溶出 (25分)

流速 : 1.0 ml/分

実施例 20

マウスTGR23-2リガンド (1-20) : Ser-Phe-Arg-Asn-Gly-Val-Gly-Ser-Gly-Ala-Lys-Lys-Thr-Ser-Phe-Arg-Arg-Ala-Lys-Gln (配列番号 : 32) の製造

市販 2-chlorotriethyl resin (Clt resin、1.12 mmol/g) にFmoc-Gln(Trt)-OHを導入したFmoc-Gln(Trt)-O-Clt resin (0.408 mmol/g) 0.25 mmol分を用い、実施例19に記載したラットTGR23-2リガンド (1-18) の製造と同様に固相合成を行ない、目的の保護ペプチド樹脂324.7 mgを得た。

20 この樹脂100 mgを実施例19と同様に処理し、白色粉末を50.0 mg得た。得られた粗ペプチドをYMC SH-343-5 S-5、120Aカラム (20 x 250 mm) を用いた分取HPLCで、A液 : 0.1% TFA-水、B液 : 0.1% TFA含有アセトニトリルによるA/B : 92/8~72/28への直線型濃度勾配溶出 (60分) を行ない、目的物を含む分画を集めて凍結乾燥し、白色粉末22.6 mgを得た。

25 ESI-MS : M^+ 2182.8 (理論値 2182.5)

HPLC溶出時間 : 14.1分

溶出条件

カラム : YMC AM 301 (4.6 x 100 mm)

溶離液 : A液 : 0.1% TFA-水、B液 : 0.1% TFA含有アセトニトリルを用い、A/B :

157

100/0～50/50へ直線型濃度勾配溶出 (25分)

流速：1.0 ml/分

実施例 2 1

- 5 FLIPRを用いたラットTGR23-2リガンド (1-18) およびマウスTGR23-2リガンド (1-20) によるTGR23-1発現CHO細胞およびTGR23-2発現CHO細胞の細胞内Caイオン濃度上昇活性の測定

実施例 1 9 に記載した方法で製造したラットTGR23-2リガンド (1-18) および実施例 2 0 に記載した方法で製造したマウスTGR23-2リガンド (1-20) を種々の濃度で実施例 5 に記載した方法でTGR23-1発現CHO細胞およびTGR23-2発現CHO細胞に投与し、細胞内Caイオン濃度上昇活性をFLIPRを用いて測定した。結果を図 1 0 および図 1 1 に示した。明らかにラットTGR23-2リガンド (1-18) およびマウスTGR23-2リガンド (1-20) は濃度依存的にTGR23-1発現CHO細胞およびTGR23-2発現CHO細胞の細胞内Caイオン濃度上昇を促進し、配列番号：1 2 および配列番号
15 : 3 2 の構造を有するペプチドがTGR23-1発現CHO細胞およびTGR23-2発現CHO細胞に対して細胞内Caイオン濃度上昇活性を示すことが明らかとなった。

実施例 2 2

- ヒトTGR23-2リガンド (1-20) およびラットTGR23-2リガンド (1-18) による
20 TGR23-1発現CHO細胞およびTGR23-2発現CHO細胞の細胞内cAMP産生促進活性の測定
- 実施例 1 7 に記載した方法で製造したヒトTGR23-2リガンド (1-20) を種々の濃度で実施例 3 に記載した方法でTGR23-1発現CHO細胞およびTGR23-2発現CHO細胞に投与し、細胞内cAMP産生促進活性を測定した。結果を図 1 2 に示す。

明らかにヒトTGR23-2リガンド (1-20) は濃度依存的にTGR23-1発現CHO細胞お
25 よびTGR23-2発現CHO細胞の細胞内cAMP産生を促進した。

また、ヒトTGR23-2リガンド (1-20) および実施例 1 9 に記載した方法で製造したラットTGR23-2リガンド (1-18) を種々の濃度でTGR23-1発現CHO細胞およびTGR23-2発現CHO細胞に投与し、上記と同様の測定をフォルスコリン無添加の条件下で実施した。ただし、産生促進活性は以下に示した式で計算し、% of control

で表した。

$$\% \text{ of control} = X/C \times 100$$

X: 試料添加群のcAMP量

C: 対照 (試料無添加、フォルスコリン刺激なし) の2 wellのcAMP量の平均値

- 5 結果を、図13および図14に示した。明らかに、フォルスコリン無添加の条件下において、ヒトTGR23-2リガンド (1-20) およびラットTGR23-2リガンド (1-18) は濃度依存的にTGR23-1発現CHO細胞およびTGR23-2発現CHO細胞の細胞内cAMP産生を促進した。

10 実施例23

ヒトTGR23-2リガンド (1-20) およびラットTGR23-2リガンド (1-18) によるTGR23-1発現CHO細胞およびTGR23-2発現CHO細胞のアラキドン酸代謝産物遊離促進活性の測定

- 15 実施例17に記載した方法で製造したヒトTGR23-2リガンド (1-20) および実施例19に記載した方法で製造したラットTGR23-2リガンド (1-18) を種々の濃度で実施例4に記載した方法でTGR23-1発現CHO細胞およびTGR23-2発現CHO細胞に投与し、アラキドン酸代謝産物遊離促進活性を測定した。結果を図15および図16に示す。

- 20 明らかにヒトTGR23-2リガンド (1-20) およびラットTGR23-2リガンド (1-18) は濃度依存的にTGR23-1発現CHO細胞およびTGR23-2発現CHO細胞のアラキドン酸代謝産物遊離を促進した。

実施例24

- 25 ヒトTGR23-2リガンド (1-20)、ラットTGR23-2リガンド (1-18) およびマウスTGR23-2リガンド (1-20) によるTGR23-2発現CHO細胞の膜画分に対するGTP γ S結合活性の測定

TGR23-2発現CHO細胞膜画分に対する [35 S]-Guanosine 5'-(γ -thio) triphosphateの結合促進活性を以下の方法により測定した。最初に膜画分の調整法を記載する。8 x 10⁷個のTGR23-2発現CHO細胞に20 mlのホモジネートバ

5 ッファー (10 mM HEPES (pH 7.3)、5 mM EDTA、0.52 mM PMSF、10 μ g/ml pepstatin、8 μ g/ml E64、20 μ g/ml leupeptin) 添加し、ポリトロン (12,000 rpm、30秒 x 3回) を用いて破碎した。細胞破碎液を遠心 (1,000 g、15分間) して上清を得た。次にこの上清を超遠心分離 (Beckman type 30ローター、30,000 rpm、1時間) し、得られた沈殿物をTGR23-2発現CHO細胞膜画分とした。

10 GTP γ S 結合活性の測定は以下の通りである。TGR23-2発現CHO細胞膜画分を膜希釈緩衝液 (50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4)、5 mM $MgCl_2$ 、150 mM NaCl、0.03% NaN_3 、0.1% BSA、1 μ M GDP) で希釈して、タンパク質濃度30 mg/mlのアッセイ用細胞膜画分溶液をつくる。アッセイ用膜画分溶液200 μ lに、50 nMの濃度の [35 S]-guanosine 5'-(γ -thio) triphosphate (NEN社) を2 μ lと試料を添加し、この混合液を25℃で一時間保温した。混合液をフィルター濾過し、さらにフィルターを洗浄用バッファー (50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4)、5 mM $MgCl_2$ 、1mM EDTA、0.03% NaN_3 、0.1% BSA) 1.5mlで2回洗浄した後、フィルターの放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

15 実施例17に記載した方法で製造したヒトTGR23-2リガンド (1-20)、実施例19に記載した方法で製造したラットTGR23-2リガンド (1-18) および実施例20に記載した方法で製造したマウスTGR23-2リガンド (1-20) を種々の濃度で上に記載した方法でTGR23-2発現CHO細胞より調製した膜画分に投与し、GTP γ S結合活性を測定した。結果を図17に示した。明らかにヒトTGR23-2リガンド (1-20)、ラットTGR23-2リガンド (1-18) およびマウスTGR23-2リガンド (1-20) は濃度依存的にTGR23-2発現CHO細胞より調製した膜画分のGTP γ S結合活性を促進した。

実施例25

25 [Nle¹⁰, Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド (1-20) : Ser-Phe-Arg-Asn-Gly-Val-Gly-Thr-Gly-Nle-Lys-Lys-Thr-Ser-Tyr-Gln-Arg-Ala-Lys-Ser (配列番号: 62) の製造

市販のBoc-Ser (Bzl)-OCH₂-PAM樹脂をペプチド合成機ACT90の反応槽に入れてDCMで膨潤した後、TFAでBocを除去し、DIEAで中和した。この

160

- 樹脂をNMPに懸濁し、HOBt-DIPCIでBoc-Lys (Cl-Z) を縮合した。反応後ニンヒドリンテストで遊離のアミノ基の有無を調べ、ニンヒドリンテストがプラスの時には同じアミノ酸を再度縮合した。再縮合後においてもニンヒドリンテストがプラスの時には無水酢酸でアセチル化した。このサイクルを繰り返し、Boc-Ala、
- 5 Boc-Arg (Tos)、Boc-Gln、Boc-Tyr (Br-Z)、Boc-Ser (Bzl)、Boc-Thr (Bzl)、Boc-Lys (Cl-Z)、Boc-Lys (Cl-Z)、Boc-Nle、Boc-Gly、Boc-Thr (Bzl)、Boc-Gly、Boc-Val、Boc-Gly、Boc-Asn、Boc-Arg (Tos)、Boc-Phe、Boc-Ser (Bzl) を配列順に縮合して所望の保護ペプチド樹脂0.14 gを得た。この樹脂をp-クレゾール2.0 mlとともにフッ化水素約15 ml中、0℃で60分攪拌した後、フッ化水素を減圧留去し、残留物にジエチルエーテルを加えて濾過した。濾過物に水と酢酸を加えペプチドを抽出し、樹脂と分離した。抽出液を濃縮し、50%酢酸で充填したセファデックス（登録商標）G-25カラム（2.0 x 80 cm）に付して同溶媒で展開し、主要画分を集めて凍結乾燥した。その一部（10.3 mg）をLiChroprep（登録商標）RP-18を充填した逆相クロマトカラム（2.6 x 60 cm）に付けて0.1% TFA水200 mlで洗浄し、
- 10 0.1% TFA水300 mlと0.1% TFA含有25%アセトニトリル水300 mlを用いた線型勾配溶出を行ない、主要画分を集め凍結乾燥し目的とするペプチド3.96 mgを得た。
- ESI-MS : M⁺ 2186.1（理論値 2185.5）

HPLC溶出時間：10.4分

カラム条件

- 20 カラム：Wakosil-II 5C18HG（4.6 x 100 mm）。
- 溶離液：A液：0.1% TFA-水、B液：0.1% TFA含有アセトニトリルを用い、A/B：95/5～55/45へ直線型濃度勾配溶出（25分）
- 流速：1.0 ml/分

25 実施例 26

ラクトパーオキシダーゼ法を用いた [Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド（1-20）の作製

DMSO 10 μ lに溶かした [Nle¹⁰, Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド（1-20）（配列番号：62で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド）1 nmolを0.1 M HEPES

161

(pH 7) に溶かした0.0003%過酸化水素水10 μ l、0.1 M HEPES (pH 7) に溶かしたラクトパーオキシダーゼ (シグマ社) 10 μ g/mlを10 μ lおよび [¹²⁵I] NaI 37 MBq (パーキンエルマーライフサイエンス社) 10 μ lと混合して室温で15分間反応させた後、生成した [Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド (1-20) を以下の条件の

5 HPLCにより分取した。

用いたカラムは、ODS-80TM (4.6 mm x 15 cm) (トーソー社)、溶出液Aとして10%アセトニトリル/0.1% TFA、溶出液Bとして60%アセトニトリル/0.1% TFAを用い、5-5 (2 min)、5-29 (40 min) %B/A+Bのグラディエント溶出法を行なった。流速は1 mL/min、カラム温度は40℃、検出は220nmとした。このHPLC条件では、

10 [Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド (1-20) は24分付近に溶出した。

実施例 2 7

[Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド (1-20) を用いたレセプター結合実験

実施例 2 6 に記載した方法によって作製した [Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リ
15 ガンド (1-20) および実施例 2 4 に記載した方法によってTGR23-2発現CHO細胞から調製したTGR23-2発現CHO細胞膜画分およびTGR23-2発現CHO細胞の代わりにTGR23-1発現CHO細胞を用いることにより実施例 2 4 に記載した方法と同様の方法によって調製したTGR23-1発現CHO細胞膜画分を用いてレセプター結合実験を行なった。

20 TGR23-1発現CHO細胞およびTGR23-2発現CHO細胞から調製した細胞膜画分をアッセイ用バッファー (20 mM Tris-HCl、5 mM EDTA、0.1% BSA、0.5 mM PMSF、1 μ g/mlペプスタチン、4 μ g/ml E-64、20 μ g/mlロイペプチン、pH 7.4) で各種濃度に希釈後、ポリプロピレン製試験管 (Falcon 2053) に200 μ lずつ分注した。最大結合量を測定するために2 μ lのDMSOと10 nMの [Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2
25 リガンド (1-20) 2 μ lを膜画分溶液に添加した。また、非特異的結合を測定するために1 μ M [Nle¹⁰, Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド (1-20) のDMSO溶液2 μ lと10 nMの [Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド (1-20) 2 μ lを膜画分溶液に添加した。25℃で90分間反応させた後、ポリエチレンイミン処理したワットマングラスフィルター (GF-F) を用いて反応液を吸引ろ過した。ろ過後、 γ -カウンターを

162

用いて濾紙上に残った放射活性を測定し、最大結合量から非特異的結合量を引いて特異的結合量を見積もった。膜画分の濃度を変化させると膜画分の濃度に依存した [Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド (1-20) の特異的な結合が認められた。被験試料のTGR23-1レセプターあるいはTGR23-2レセプターに対する結合阻害活性 (阻害率 (%)) は、最大結合量 (TB) から被検試料および [Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド (1-20) を加えたときに濾紙上に残った放射活性 (X) を減じた値の特異的結合量 (SB) に対する比率 ((TB-X)/SB x 100 (%)) で示される。

TGR23-2発現CHO細胞から調製した膜画分について膜画分濃度を1 μg/mlに設定して阻害率からヒトTGR23-2リガンド (1-20)、ラットTGR23-2リガンド (1-18) およびマウスTGR23-2リガンド (1-20) の50%阻害濃度 (IC₅₀値) を算出したところ、IC₅₀値はそれぞれ105 pM (ヒトTGR23-2リガンド (1-20))、92.8 pM (ラットTGR23-2リガンド (1-18)) および24.5 pM (マウスTGR23-2リガンド (1-20)) であった。

種々の濃度におけるヒトTGR23-2リガンド (1-20)、ラットTGR23-2リガンド (1-18) およびマウスTGR23-2リガンド (1-20) の結合阻害活性を、図 18 に示す。

実施例 28

ヒト結腸癌細胞 COLO 205 由来の TGR23 遺伝子のクローニング

ATCCより入手したCOLO 205細胞を75 cm²フラスコに培養し、増殖した細胞からISOGEN (ニッポンジーン社) を用いてtotal RNA画分を調製した。COLO 205細胞のtotal RNA 0.5 μgを鋳型に、ReverTra Ace -α- (TOYOBO社) を用い、添付のマニュアルにしたがってランダムプライマーを用いて逆転写を行ない、cDNAを作製した。作製したCOLO 205細胞のcDNAを鋳型とし、プライマー 1 (配列番号: 5) およびプライマー 2 (配列番号: 6) を用いてPCR反応を行なった。PCR反応の液量は50 μlとし、組成は、鋳型としてcDNA調製液を12.5 ng mRNA相当分、プライマー各0.2 μM、dNTP 0.2 mM、GC-Melt 0.5M、Advantage-GC 2 Polymerase Mix (クロンテック社) 1/50 volumeおよび5倍濃縮Buffer 1/5

163

volumeとした。反応は、96℃で2分保温した後、96℃・30秒、54℃・30秒、72℃・1分のサイクルを35回繰り返した後、72℃で10分保温して行なった。得られた反応液を用い、TOPO TA cloning kit (インビトロジェン社)を用いてプラスミドベクターpCR2.1-TOPOへサブクローニングし、大腸菌DH5 α -TIへ導入した。生じた形質転換体からQIAwell 8 Ultra Plasmid Kit (QIAGEN社)を用いてプラスミドDNAを精製した。塩基配列決定のための反応は、BigDye Terminator Cycle Sequence Ready Reaction Kit (パーキンエルマー社)を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。

その結果、配列番号：64で表される塩基配列および配列番号：66で表される塩基配列がそれぞれ得られた。

配列番号：64および配列番号：66の塩基配列には、開始コドンであるATGから終止コドンであるTGAに至る翻訳枠が存在した。この翻訳枠から翻訳される蛋白のアミノ酸配列を配列番号：63および配列番号：65にそれぞれ示す。配列番号：63および配列番号：65で表されるアミノ酸配列を含有する新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をTGR23-1AおよびTGR23-1Bとそれぞれ命名した。

配列番号：64で表される塩基配列は、配列番号：2で表される塩基配列の(TGR23-1)の第723番目のCがGに置換されている。

配列番号：66で表される塩基配列は、配列番号：2で表される塩基配列(TGR23-1)の第320番目のAがTに、第723番目のCがGにそれぞれ置換されている。

配列番号：63で表されるアミノ酸配列は、配列番号：1で表されるアミノ酸配列(TGR23-1)の第241番目のSerがArgに置換されている。

配列番号：65で表されるアミノ酸配列は、配列番号：1で表されるアミノ酸配列(TGR23-1)の第107番目のAsnがIleに、第241番目のSerがArgにそれぞれ置換されている。

実施例29

マウス脳由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするcDNA

のクローニングと塩基配列の決定

マウス Marathon Ready cDNA (CLONTECH社) を鋳型とし、2個のプライマー、プライマー1 (配列番号: 81) およびプライマー2 (配列番号: 82) を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記cDNA 2.5 μ l を鋳型として使用し、Advantage 2 Polymerase Mix (CLONTECH社) 1 μ l、プライマー1 (配列番号: 81) およびプライマー2 (配列番号: 82) を各0.2 μ M、dNTPs を800 μ M加え、50 μ l の液量とした。PCR反応は、95℃・1分の後、95℃・30秒、72℃・4分のサイクルを3回、95℃・30秒、70℃・4分のサイクルを3回、95℃・30秒、68℃・4分のサイクルを30回繰り返す、最後に68℃・4分の伸長反応を行った。次にアガロースゲル電気泳動を行い、GENECLEAN SPIN Kit (BIO101社) を用いて該PCR反応産物を精製した。これを TOPO TA クローニングキット (Invitrogen社) の処方に従いプラスミドベクターpCR2.1-TOPO (Invitrogen社) へサブクローニングした。これを大腸菌DH5 α に導入し、cDNAを持つクローンをアンピシリンを含むLB寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするcDNA配列 (配列番号: 76) を得た (WO 02/31145 に記載の配列番号: 15)。このDNA配列がコードするアミノ酸配列 (配列番号: 75) を含有するGタンパク質共役型レセプタータンパク質をマウスTGR23-Bと命名した (WO 02/31145 に記載の配列番号: 14)。

マウスTGR23-Bは、参考例3に記載のマウスTGR23-Aと比較すると、マウスTGR23-Aの280番目のGのあとに54塩基が挿入されている形になり、アミノ酸としても18残基が挿入されることになる。

また、同時にマウスTGR23-Bの変異型レセプターをコードするcDNA配列 (配列番号: 84) も得られた。この配列では、マウスTGR23-BのDNA配列の478番目のGの直後にCAGの3塩基が挿入されており、アミノ酸配列の160番目のGluの直前にAlaが挿入されていた。この配列 (配列番号: 84) がコードする、160番目のGluの直前にAlaが挿入されたアミ

165

ノ酸配列（配列番号：83）を含有する新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をマウスTGR23-Cと命名した。

配列番号：76で表される塩基配列を有するDNA断片を有するプラスミドをpCR2.1-mTGR23-Bと名付け、プラスミドpCR2.1-mTGR2
5 3-Bが導入された形質転換体を、大腸菌（*Escherichia coli*）DH5 α /pCR2.1-mTGR23-Bと命名した。

実施例30

ラット脳由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするcDNA
10 のクローニングと塩基配列の決定

ラットMarathon Ready cDNA（CLONTECH社）を鋳型とし、2個のプライマー、プライマー1（配列番号：79）およびプライマー2（配列番号：80）を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記cDNA2.5 μ lを鋳型として使用し、Advantage2 Pol
15 ymerase Mix（CLONTECH社）1 μ l、プライマー1（配列番号：79）およびプライマー2（配列番号：80）を各0.2 μ M、dNTPsを800 μ M、および酵素にDMSOを2 μ l加え、50 μ lの液量とした。PCR反応は、95 $^{\circ}$ C・1分の後、95 $^{\circ}$ C・30秒、72 $^{\circ}$ C・4分のサイクルを5回、95 $^{\circ}$ C・30秒、70 $^{\circ}$ C・4分のサイクルを5回、95 $^{\circ}$ C・30秒、68 $^{\circ}$ C
20 ・4分のサイクルを30回繰り返し、最後に68 $^{\circ}$ C・3分の伸長反応を行った。次にアガロースゲル電気泳動を行い、GENECLEAN SPIN Kit（BIO101社）を用いて該PCR反応産物を精製した。これをTOPO TA クローニングキット（Invitrogen社）の処方に従いプラスミドベクターpCR2.1-TOPO（Invitrogen社）へサブクローニングし
25 た。これを大腸菌DH5 α に導入し、cDNAを持つクローンをアンピシリンを含むLB寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、参考例4に記載のラットTGR23-1（配列番号：77）をコードするcDNA配列（配列番号：78）のほかに、5種のラットTGR23変異型レセプターをコードするcDNA配列を得た。すなわち、それらは、ラットTGR23-1と比較

166

して、塩基配列の1031番目のAがGに置換したもの（配列番号：86）、塩基配列の772番目のTがCに置換したもの（配列番号：88）、塩基配列の653番目のTがCに置換したもの（配列番号：90）、塩基配列の478番目のGの直後にCAGの3塩基が挿入されたもの（配列番号：92）および塩基配列
5 の478番目のGの直後にCAGの3塩基が挿入され、かつ、塩基配列の1031番目のAがGに置換したもの（配列番号：94）であった。

これらのDNA配列がコードするアミノ酸配列を含有する新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質を、それぞれ、ラットTGR23-2（配列番号：85）、ラットTGR23-3（配列番号：87）、ラットTGR23-4（配列
10 番号：89）、ラットTGR23-5（配列番号：91）、ラットTGR23-6（配列番号：93）と命名した。

それぞれの変異体のアミノ酸配列はラットTGR23-1と比較して、ラットTGR23-2ではアミノ酸配列の344番目のGlnがArgに置換され、ラットTGR23-3ではアミノ酸配列の258番目のCysがArgに置換され
15 、ラットTGR23-4ではアミノ酸配列の218番目のValがAlaに置換され、ラットTGR23-5ではアミノ酸配列の160番目のGluの直前にAlaが挿入され、ラットTGR23-6ではアミノ酸配列の160番目のGluの直前にAlaが挿入されてさらにアミノ酸配列の344番目のGlnがArgに置換されている。

20 配列番号：86、配列番号：88、配列番号：90、配列番号：92および配列番号：94でそれぞれ表される塩基配列を有するDNA断片を有するプラスミドを、それぞれpCR2.1-rTGR23-2、pCR2.1-rTGR23-3、pCR2.1-rTGR23-4、pCR2.1-rTGR23-5およびpCR2.1-rTGR23-6と名付け、それらのプラスミドが導入された形質
25 転換体大腸菌（*Escherichia coli*）を、それぞれ、大腸菌DH5 α /pCR2.1-rTGR23-2、大腸菌DH5 α /pCR2.1-rTGR23-3、大腸菌DH5 α /pCR2.1-rTGR23-4、大腸菌DH5 α /pCR2.1-rTGR23-5、および大腸菌DH5 α /pCR2.1-rTGR23-6と命名した。

実施例 3 1

TaqMan PCR法を用いたヒト結腸癌細胞株およびヒト胃癌細胞株のヒトTGR23遺伝子発現量の定量

- 5 ヒト結腸癌細胞株DLD-1、HCT 116、COLO 320DM、COLO 201、COLO 205、LoVo、SW 403、SW 48、SW 948、Caco-2、HT-29、SK-CO-1、T84、SNU-C1はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションより入手した。ヒト結腸癌細胞株COLO 320HSR、HCT-15、LS 174T、LS 180、SW 480、SW 1116、SW 1417、WiDrおよびヒト胃癌細胞株AGS、KATOIIIは大日本製薬社より入手した。各々の細胞を75 cm²フラスコに培養し、増殖した細胞からISOGEN（ニッポンジーン社）を用いてtotal RNA画分を調製した。各々の細胞のtotal RNA 0.5 μgを鋳型に、ReverTra Ace - α- (TOYOBO社)を用い、添付のマニュアルにしたがってランダムプライマーを用いて逆転写を行ない、cDNAを作製した。得られたtotal RNA 25 ng相当の逆転写産物、または後に述べるようにして作製した標準cDNA、1xUniversal PCR Master Mix (PEバイオシステムズ社)、配列番号：9で表されるプライマーおよび配列番号：10で表されるプライマー各500 nM、および配列番号：11 (Fam-acctggtttg ccgagtggc cgctatatt-Tamra; 配列中、Famは6-carboxy-fluoresceinを、Tamraは6-carboxy-tetramethyl-rhodamine をそれぞれ示す)で表される TaqManプローブ 100 nMを含む反応混合液25 μlについてABI PRISM 7700 Sequence Detector (PEバイオシステムズ社)を用いてPCRを行なった。PCRは、50℃・2分、95℃・10分で処理後、95℃・15秒、60℃・60秒のサイクルを40回繰り返すことにより行なった。

- 標準cDNAは、参考例1で得られたプラスミドpTB2174の260nmの吸光度を測定して濃度を算出し、正確なコピー数を算出した後、1mM EDTAを含む10mM Tris-HCl (pH8.0) 溶液で希釈し、1コピーから1x10⁶コピーの標準cDNA溶液を調製した。また、TaqMan PCR用プローブおよびプライマーはPrimer Express (Version1.0) (PEバイオシステムズ社)により設計した。

発現量はABI PRISM 7700 SDSソフトウェアによって算出した。リポーターの蛍光強度が設定された値に達した瞬間のサイクル数を縦軸にとり、標準cDNAの初期

168

濃度の対数値を横軸にとり、標準曲線を作成した。標準曲線より各逆転写産物の初期濃度を算出し、各クローンのtotal RNA 25 ng当たりのヒトTGR23遺伝子発現量を求めた。さらに各々のサンプルのGAPDH発現量をGAPDH Control Reagents (PEバイオシステムズ社) を用いて同様のTaqMan PCR法により求め、

5 ヒトTGR23遺伝子発現量の補正を行なった。

その結果、GAPDHに対するヒトTGR23の発現量は、DLD-1では0.000022%, HCT 116では0.0013%, COLO 320DMでは0.0017%, COLO 201では1.0%, COLO 205では3.7%, LoVoでは0.031%, SW 403では0.95%, SW 48では0.00031%, SW 948では0.0001%, Caco-2では0.0001%, HT-29では0.034%, SK-CO-1では0.51%, T84では

10 0.0027%, SNU-C1では0.26%, COLO 320HSRでは0.0001%, HCT-15では0.0001%, LS 174Tでは1.0%, LS 180では0.85%, SW 480では0.0001%, SW 1116では0.0018%, SW 1417では0.0055%, WiDrでは0.00082%, AGSでは0.0002%, KATOIIIでは1.2%であった。

これによりヒトTGR23は、結腸癌細胞であるCOLO 201、COLO 205、LoVo、

15 SW 403、HT-29、SK-CO-1、SNU-C1、LS 174T、LS 180および胃癌細胞であるKATOIIIにおいて特に発現が亢進していることがわかった。

ヒトTGR23の癌細胞株における発現量のグラフを〔図20〕に示す。

なお、ヒト結腸癌由来癌細胞株COLO205は参考例2においてもそのTGR23の発現量を測定し、高い発現を示すことを認めている。 β -アクチンに対する発現量は

20 2.1%であった。

実施例32

ヒト結腸癌細胞LS 174T、LS 180、SW 403、およびヒト胃癌細胞KATOIII由来のヒトTGR23遺伝子のクローニング

25 大日本製薬社より入手したLS 174T細胞を75 cm²フラスコに培養し、増殖した細胞からISOGEN (ニッポンジーン社) を用いてtotal RNA画分を調製した。LS 174T細胞のtotal RNA 0.5 μ gを鋳型に、ReverTra Ace - α - (TOYOBO社) を用い、添付のマニュアルにしたがってランダムプライマーを用いて逆転写を行ない、cDNAを作製した。作製したLS 174T細胞のcDNAを鋳型とし、プライマー1 (配列

番号：5) およびプライマー2 (配列番号：6) を用いてPCR反応を行なった。
PCR反応の液量は50 μ lとし、組成は、鋳型としてcDNA調製液を12.5 ng
mRNA相当分、プライマー各0.2 μ M、dNTP 0.2m M、GC-Melt 0.5M、Advantage-GC
2 Polymerase Mix (クロンテック社) 1/50 volumeおよび5倍濃縮Buffer 1/5
5 volumeとした。反応は、96℃で2分保温した後、96℃・30秒、54℃・30秒、72℃
・1分のサイクルを35回繰り返した後、72℃で10分保温して行なった。得られた
PCR反応液を電気泳動後、目的のバンドをGel Extraction Kit (QIAGEN社) を用
いて精製した。得られた反応液をTOPO TA cloning kit (インビトロジェン社) を
用いてプラスミドベクターpCR2.1-TOPOへサブクローニングし、大腸菌DH5 α -T1
10 へ導入した。生じた形質転換体からQIAwell 8 Ultra Plasmid Kit (QIAGEN社)
を用いてプラスミドDNAを精製した。塩基配列決定のための反応は、BigDye
Terminator Cycle Sequence Ready Reaction Kit (パーキンエルマー社) を用い
て行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。

その結果、配列番号：2で表される塩基配列および配列番号：96で表される
15 塩基配列がそれぞれ得られた。配列番号：96で表される塩基配列には、開始コ
ドンであるATGから終止コドンであるTGAに至る翻訳枠が存在した。この翻
訳枠から翻訳されるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：95に示す。

配列番号：96で表される塩基配列は、配列番号：2で表される塩基配列 (TGR23-1) の第320番目のAがTに置換されている。

20 配列番号：95で表されるアミノ酸配列は、配列番号：1で表されるアミノ酸
配列 (TGR23-1) の第107番目のAsnがIleに置換されている。

配列番号：95で表されるアミノ酸配列を含有する新規Gタンパク質共役型レ
セプタータンパク質を、ヒトTGR23-1Cと命名した。

25 アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションより入手したSW 403細胞につ
いても同様にしてヒトTGR23遺伝子のクローニングを行ない、配列を解読し
たところ、配列番号：2で表される塩基配列が得られた。

大日本製薬社より入手したLS 180細胞とKATOIII細胞についても同様にしてヒ
トTGR23遺伝子のクローニングを行ない、配列を解読したところ、LS 180細
胞からは配列番号：98で表される塩基配列が、KATOIII細胞からは配列番号：

170

99で表される塩基配列がそれぞれ得られた。なおPCR反応の組成は、鋳型としてcDNA調製液を12.5 ng mRNA相当分、プライマー各0.2 μ M、dNTP 0.2m M、MgCl₂ 2mM、Ex Taq Polymerase (TOYOBO社) 1.25unitsおよび10倍濃縮Buffer 1/10 volumeとした。

- 5 配列番号：98で表される塩基配列には、開始コドンであるATGから終止コドンであるTGAに至る翻訳枠が存在し、この翻訳枠から翻訳されるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：97に示す。

配列番号：99で表される塩基配列には、開始コドンであるATGから終止コドンであるTGAに至る翻訳枠が存在し、この翻訳枠から翻訳されるタンパク質

- 10 のアミノ酸配列を配列番号：95に示す。

配列番号：98で表される塩基配列は、配列番号：2で表される塩基配列（TGR23-1）の第1031番目のAがGに、第1071番目のTがCにそれぞれ置換されている。

- 15 配列番号：99で表される塩基配列は、配列番号：2で表される塩基配列（TGR23-1）の第320番目のAがTに、第648番目のCがTにそれぞれ置換されている。

配列番号：97で表されるアミノ酸配列は、配列番号：1で表されるアミノ酸配列（TGR23-1）の第344番目のGlnがArgに置換されている。

- 20 配列番号：97で表されるアミノ酸配列を含有する新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質を、ヒトTGR23-1Dと命名した。

実施例33

ヒト視床下部のTGR23遺伝子のクローニング

- 25 ヒト視床下部Marathon-Ready cDNA（クロンテック社）を鋳型とし、プライマー1（配列番号：5）およびプライマー2（配列番号：6）を用いてPCR反応を行なった。PCR反応の液量は50 μ lとし、組成は、cDNA溶液を 1/10 volume、プライマー各0.2 μ M、dNTP 0.2m M、MgCl₂ 2mM、Ex Taq Polymerase (TOYOBO社) 1.25unitsおよび10倍濃縮Buffer 1/10 volumeとした。反応は、96℃で2分保温した後、96℃・30秒、54℃・30秒、72℃・1分のサイクルを35回繰り返した後

171

、72℃で10分保温して行なった。得られたPCR反応液を電気泳動後、目的のバンドをGel Extraction Kit (QIAGEN社) を用いて精製した。得られた反応液をTOPO TA cloning kit (インビトロジェン社) を用いてプラスミドベクターpCR2. 1-TOPOへサブクローニングし、大腸菌DH5 α -T1へ導入した。生じた形質転換体から

- 5 QIAwell 8 Ultra Plasmid Kit (QIAGEN社) を用いてプラスミドDNAを精製した。塩基配列決定のための反応は、BigDye Terminator Cycle Sequence Ready Reaction Kit (パーキンエルマー社) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。

- その結果、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：98、配列番号：100
10 および配列番号：101で表される5種類の塩基配列がそれぞれ得られた。

配列番号：100で表される塩基配列は、配列番号：2で表される塩基配列の第320番目のAがTに、第396番目のCがGにそれぞれ置換されている。

- 配列番号：101で表される塩基配列は、配列番号：2で表される塩基配列の第320番目のAがTに、第1031番目のAがGに、第1071番目のTがC
15 にそれぞれ置換されている。

- 配列番号：2、配列番号：4、配列番号：98、配列番号：100および配列番号：101の塩基配列には、開始コドンであるATGから終止コドンであるTGAに至る翻訳枠が存在した。この翻訳枠から翻訳されるタンパク質は、それぞれ、この順にヒトTGR23-1（配列番号：1）、ヒトTGR23-2（配列
20 番号：3）、ヒトTGR23-1D（配列番号：97）、ヒトTGR23-1C（配列番号：95）およびヒトTGR23-2（配列番号：3）である。

実施例34

- ヒトTGR23-2リガンド(1-20)のラット側脳室内投与による摂餌量に及ぼす影響
25 を検討した。

ラットは、照明時間を8時から20時、室温25℃において飼育した。8週齢Wistar系雄性ラット（手術時体重260～280 g）をペントバルビタール50 mg/kgの腹腔内投与にて麻酔し、ラット脳定位固定装置に固定した。切歯用バーはインターオーラルラインから3.3 mm低くした。頭蓋骨を露出し、側脳室にガイドカニューレA

G-8（内径0.4 mm、外径0.5 mm、エイコム）を埋め込むために歯科用ドリルを用いて骨に穴を開けた。また、その周囲3箇所アンカービスを埋めた。ステンレス製ガイドカニューレ、AG-8を、その先端が側脳室の上部に位置するように挿入した。定位座標は、PaxinosとWatson(1998)のアトラスに従い、ブレグマより、AP: -0.8 mm、L: 1.5 mm、H: -4.5mmとした。ガイドカニューレは歯科用セメントおよびアンカービスで頭蓋骨に固定した。ガイドカニューレにはステンレス製ダミーカニューレ、AD-8（外径 0.35 mm、エイコム社）を挿入し、キャップナット（エイコム社）で固定した。術後、ラットは個別のケージで飼育し、粉末飼料へ1週間馴化させた。

- 10 ガイドカニューレを埋め込んでから約1週間飼育して術後の回復および粉末飼料への馴化を待ち、ラットの頭蓋骨に装着したキャップナットとダミーカニューレを取り外し、代わりにPTFE（ポリ四フッ化エチレン）チューブ（長さ50 cm、内径0.1 mm、外径0.35 mm、エイコム社）につないだステンレス製マイクロインジェクションカニューレAMI-9（内径0.17 mm、外径0.35 mm、エイコム社）を挿入した。マイクロインジェクションカニューレの長さは、その先端1 mmがガイドカニューレから露出するように調節しておいた。PTFEチューブの一方をマイクロシリンジポンプにつなぎ、大塚蒸留水、ヒトTGR23-2リガンド(1-20)を溶解させた蒸留水を5 μ l/分の流速で計10 μ l (10 nmol/rat)を側脳室に注入した。
- 15 。注入終了後2分待ってからマイクロインジェクションカニューレを取り外し、
- 20 再びダミーカニューレをキャップナットで固定した。注入は、19時から20時の間に行ない、その後の摂餌量を摂餌量測定措置Feed-Scale（Columbus社）を用いて30分毎に投与4時間後まで経時的に測定した。

結果を〔図21〕に示す。これより、ヒトTGR23-2リガンド(1-20)投与群は対象群に比し、投与1.5および2時間後において有意（ $p < 0.05$ ）な摂餌量の減少が認められた。

実施例35

ヒトTGR23-2リガンド(1-20)のヒト結腸癌細胞株LS 174Tのヌードマウスでの腫瘍増殖に及ぼす影響を検討した。

173

Phosphate buffer saline (PBS) に溶解したLS 174Tを 4×10^6 cells/ 200μ l/mouseの割合で雌性ヌードマウス (BALB/cAnN-nu, 6週齢) の左腹部皮下に投与した。投与3時間後に、大塚蒸留水に2 mM濃度に溶解したヒトTGR23-2リガンド (1-20) または大塚蒸留水 100μ lをMICRO-OSMOTIC PUMP (alza社、model 1002) に充填し、エーテル麻酔下でマウス背部皮下に埋め込んだ (各群 n=10)。この日より、ヒトTGR23-2リガンド (1-20) は、48 nmol/dayで14日間持続的に放出されることになる。投与3日後より腫瘍のスケールを測定し、腫瘍体積は (長径) \times (短径) $^2/2$ で算出した。

結果を〔図22〕に示す。これより、投与11日目から20日目まで、ヒトTGR23-2リガンド (1-20) 投与群においてLS 174Tの腫瘍体積の増大傾向が観察された。

実施例36

ヒトTGR23-1A、ヒトTGR23-1CおよびヒトTGR23-1D発現ベクターの構築

ヒトTGR23-1A (配列番号: 63)、ヒトTGR23-1C (配列番号: 95) およびヒトTGR23-1D (配列番号: 97) をコードするDNAをQuick change site-directed mutagenesis キット (Stratagene) を用いてヒトTGR23-1のDNAより調製した。ヒトTGR23-1のDNAに以下のようにしてPCR法により部位特異的変異を導入した。PCR反応液は、5 ngの実施例15に記載のpAKK0-TGR23-1、2 mMのdNTPs、0.4 μ Mの変異導入用フォワードプライマーおよび変異導入用リバースプライマー〔pAKK0-TGR23-1A作製用フォワードプライマー (配列番号: 106)、pAKK0-TGR23-1A作製用リバースプライマー (配列番号: 107)、pAKK0-TGR23-1C作製用フォワードプライマー (配列番号: 108)、pAKK0-TGR23-1C作製用リバースプライマー (配列番号: 109)、pAKK0-TGR23-1D作製用フォワードプライマー (配列番号: 110)、pAKK0-TGR23-1D作製用リバースプライマー (配列番号: 111)〕、2.5 unitのpfuポリメラーゼにキットに添付のPCR反応用バッファーを加え、全容量を 50μ lとした。この反応液を、95℃で30秒間保温し、その後95℃・30秒、55℃・60秒、68℃・14分を12回繰り返す反応に供した。PCR反応の後、鋳型pAKK0-TGR23-1を分解するため、 1μ lのDpn I (10 unit/ μ l) を反応液に添加し、37℃で1時間保温した。コンピーテント細胞であるTOP10 (Invitrogen) を、 1μ l

のDpn I反応液でヒートショック法により形質転換した。これらの形質転換大腸菌からプラスミドDNAをQIAwell 8 Ultra Plasmid kit (Qiagen)を用いて取得した。塩基配列の決定のための反応は、DyeDeoxyTerminator Cycle Sequence Kit (Applied Biosystems)を用いて行ない、次に、各DNAの塩基配列をABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems)を用いて解析して変異が導入されていることを確認した。

ヒトTGR23-1A、ヒトTGR23-1CおよびヒトTGR23-1D発現ベクターは、動物細胞発現ベクターであるpAKK0のSal IサイトとSpe Iサイトに、変異の導入が確認されたヒトTGR23-1A、ヒトTGR23-1CおよびヒトTGR23-1Dをライゲーションすることにより構築した。DNA配列解析から変異の導入が確認されたプラスミドDNAをSal IとSpe Iで消化し、DNA溶液を1.5% アガロースゲルで電気泳動して5'末端にSal I切断端を、また3'末端にSpe I切断端を持つヒトTGR23-1A、ヒトTGR23-1CおよびヒトTGR23-1DのDNA断片をそれぞれアガロースゲルからDNA Extraction Kit (Qiagen)を用いて回収した。このDNA断片をpAKK0のSal IとSpe IサイトにTakara ligation kit ver. 2 (Takara)を用いて結合させた。コンピーテント細胞である大腸菌 (Escherichia coli) TOP10 (Invitrogen)またはDH5 α (Toyobo)をライゲーション反応液により形質転換して形質転換体を作製し、大腸菌TOP10/pAKK0-TGR23-1A、大腸菌DH5 α /pAKK0-TGR23-1Cおよび大腸菌DH5 α /pAKK0-TGR23-1Dと命名した。

20

実施例 3 7

ヒトTGR23-1B発現ベクターの構築

ヒトTGR23-1B (配列番号: 65) をコードするDNAをQuick change site-directed mutagenesis キット (Stratagene)を用いて調製した。ヒトTGR23-1CのDNAに以下のようにしてPCR法により部位特異的変異を導入した。PCR反応液は、5 ngのpAKK0-TGR23-1C (実施例 3 6 で得られたプラスミド)、2 mMのdNTPs、0.4 μ Mの変異導入用フォワードプライマーと変異導入用リバースプライマー [pAKK0-TGR23-1B作製用フォワードプライマー (配列番号: 112)、pAKK0-TGR23-1B作製用リバースプライマー (配列番号: 113)]、2.5 unitのpfuポリメラーゼ

- にキットに添付のPCR反応用バッファーを加え、全容量を50 μ lとした。この反応液を、95℃で30秒間保温し、その後95℃・30秒、55℃・60秒、68℃・14分を12回繰り返す反応に供した。PCR反応の後、鑄型pAKK0-TGR23-1Cを分解するため、1 μ lのDpn I (10 unit/ μ l)を反応液に添加し、37℃で1時間保温した。コンピ
- 5 ーテント細胞であるTOP10 (Invitrogen)を、1 μ lのDpn I反応液でヒートショック法により形質転換した。これらの形質転換大腸菌からプラスミドDNAをQIAwell 8 Ultra Plasmid kit (Qiagen)を用いて取得した。塩基配列の決定のための反応はDyeDeoxyTerminator Cycle Sequence Kit (Applied Biosystems)を用いて行ない、次に、ヒトTGR23-1BのDNAの塩基配列をABI PRISM 377 DNA Sequencer
- 10 (Applied Biosystems)を用いて解析して変異が導入されていることを確認した。
- ヒトTGR23-1B発現ベクターは、動物細胞発現ベクターであるpAKK0のSal IサイトとSpe Iサイトに、変異の導入が確認されたヒトTGR23-1Bをライゲーションすることにより構築した。DNA配列解析から変異の導入が確認されたプラスミドDNAをSal IとSpe Iで消化し、DNA溶液を1.5% アガロースゲルで電気泳動して5' 末端に Sal I切断端を、また3' 末端にSpe I切断端を持つTGR23-1B DNA断片をアガ
- 15 ロースゲルからDNA Extraction Kit (Qiagen)を用いて回収した。このDNA断片をpAKK0のSal IとSpe IサイトにTakara ligation kit ver. 2 (タカラ)を用いて結合させた。コンピテント細胞である大腸菌 (Escherichia coli) TOP10 (Invitrogen)をライゲーション反応液により形質転換して形質転換体を作製し、
- 20 大腸菌TOP10/pAKK0-TGR23-1Bと命名した。

実施例 3 8

ヒトTGR23-1A、ヒトTGR23-1B、ヒトTGR23-1CおよびヒトTGR23-1D発現CHO細胞株の作製

- 25 Escherichia coli TOP10/pAKK0-TGR23-1A、Escherichia coli TOP10/pAKK0-TGR23-1B、Escherichia coli DH5 α /pAKK0-TGR23-1CおよびEscherichia coli DH5 α /pAKK0-TGR23-1Dを培養し、これら大腸菌体からPlasmid Midi Kit (Qiagen)を用いてプラスミドDNAをそれぞれ調製した。これらのプラスミドDNAをEffectene Transfection Reagent (Qiagen)を用いて添付のプロトコールに従っ

176

てCHO dhfr^r細胞に導入した。2 μ gのプラスミドDNAとトランスフェクション試薬との混合液を48時間前に1 x 10⁶個のCHO dhfr^r細胞を播種した直径10cmシャーレに添加した。10%ウシ胎児血清を含むMEM α 培地で1日間培養した後、継代し、選択培地である10%透析ウシ胎児血清を含む核酸不含MEM α 培地で培養した。選択培地中に増殖してくるヒトTGR23-1A発現細胞、ヒトTGR23-1B発現細胞、ヒトTGR23-1C発現細胞およびヒトTGR23-1D発現細胞のコロニーを、それぞれ最大で40個選択した。

実施例 3 9

- 10 TaqMan PCR法を用いたヒトTGR23-1A、ヒトTGR23-1B、ヒトTGR23-1CおよびヒトTGR23-1D発現CHO細胞株における導入遺伝子発現量の測定

実施例 3 8 で作製したヒトTGR23-1A、ヒトTGR23-1B、ヒトTGR23-1CまたはヒトTGR23-1D発現CHO細胞株をそれぞれ25 cm²フラスコに培養し、増殖した細胞からRNeasy Protect Kit (Qiagen)を用いてtotal RNAを調製した。Total RNAを鋳型としたcDNA合成反応液は、0.5 μ gのtotal RNA、25 pmolのランダムノナマー (Takara)、1 mMのdNTPs、1 μ lのReverTra Ace (Toyobo) およびキットに付属の反応バッファーからなり、全容量は20 μ lである。逆転写反応はサーマルサイクラー (Takara) を用いて、30°C・10 min、次に42°C・60 min、最後に99°C・5 minの条件で行なった。

- 20 標準ヒトTGR23-2部分DNAは、全長ヒトTGR23-2のDNAを鋳型としたPCR増幅DNAを精製することにより調製した。PCR反応液は、10 ngのpTB2174 (参考例 1)、1 μ Mの合成DNAフォワードプライマー (配列番号：1 1 4)、1 μ Mの合成DNAリバープライマー (配列番号：1 1 5)、0.2mMのdNTPs、2.5 UのPfu Turbo DNA polymerase (Stratagene) および2 x GC buffer I (TaKaRa) 25 μ lからなり、全容量を50 μ lとした。増幅のための反応はサーマルサイクラー (Applied Biosystems) を用い、95°C・60秒の加熱の後、95°C・60秒、55°C・60秒、72°C・70秒のサイクルを25回繰り返し、最後に72°C・10分間保温した。PCR増幅DNAはアガロースゲルにて電気泳動後、QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)を用いて回収した。該PCR反応産物をpCR-BluntII-TOPO (Invitrogen) ヘサブクローニン

グした。これを大腸菌TOP10 (Invitrogen) に導入し、TGR23-2のcDNAを持つ形質転換体をカナマイシンを含むLB寒天培地中で選択した。ここで得られたヒトTGR23-2のcDNAを持つ大腸菌よりQuantum Prep Plasmid Miniprep Kit (BIO-RAD) を用いてプラスミドを回収し、260 nmの吸収から計算されたDNA量とDNA塩基組成からこのDNA溶液に含まれるヒトTGR23-2部分DNAのコピー数を算出した。DNAコピー数が明らかとなったヒトTGR23-2部分DNAを標準ヒトTGR23-2部分DNAとして、定量を目的としたTaqMan PCRに用いた。

ヒトTGR23-1A、ヒトTGR23-1B、ヒトTGR23-1CまたはヒトTGR23-1D発現細胞株の導入遺伝子発現コピー数をTaqMan PCR法により決定した。TaqMan PCR反応液は、2 μ lの逆転写cDNA溶液または1 μ lの各種濃度の標準ヒトTGR23-2部分DNA、0.2 μ Mの合成DNAフォワードプライマー（配列番号：9）、0.2 μ Mの合成DNAリバースプライマー（配列番号：10）、0.2 μ MのTaqManプローブ（配列番号：11）とTaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) からなり、全容量は25 μ lとした。PCR反応は、ABI PRISM 7700 Sequence Detector System (Applied Biosystems) を用い、50℃・2分、95℃・10分で保温し、次に95℃・15秒、60℃・60秒のサイクルを40回繰り返すことにより行なった。ヒトTGR23-1A、ヒトTGR23-1B、ヒトTGR23-1CまたはヒトTGR23-1D発現細胞株の導入遺伝子発現量はABI PRISM 7700 SDSソフトウェアによって算出した。リポーターの蛍光強度が設定された値に達した瞬間のサイクル数を縦軸にとり、種々の標準ヒトTGR23-2部分DNAのコピー数の対数値を横軸にとって標準曲線を作成した。標準曲線から逆転写cDNAに含まれる導入遺伝子の発現コピー数を算出し、total RNA 1ng当たりの導入遺伝子発現量を決定した。ヒトTGR23-1A遺伝子高発現細胞株としてクローンNo. 60を、ヒトTGR23-1B遺伝子高発現細胞株としてクローンNo. 59を、ヒトTGR23-1C遺伝子高発現細胞株としてクローンNo. 9を、ヒトTGR23-1D遺伝子高発現細胞株としてクローンNo. 12をそれぞれ選択した。

実施例40

FLIPRを用いたヒトTGR23-2リガンド（1-20）によるヒトTGR23-1A、ヒトTGR23-1B、ヒトTGR23-1CまたはヒトTGR23-1D発現CHO細胞の細胞内Caイオン濃度上昇活性

の測定

ヒトTGR23-2リガンド (1-20) を種々の濃度で実施例 5 に記載した方法にした
がって、ヒトTGR23-1A発現CHO細胞、ヒトTGR23-1B発現CHO細胞、ヒトTGR23-1C発
現CHO細胞およびヒトTGR23-1D発現CHO細胞にそれぞれ投与し、細胞内Caイオン濃
5 度上昇活性をFLIPRを用いて測定した。結果を図 2 3、図 2 4、図 2 5 および図
2 6 に示す。

明らかに、ヒトTGR23-1A発現CHO細胞、ヒトTGR23-1B発現CHO細胞、ヒトTGR23-
1C発現CHO細胞およびヒトTGR23-1D発現CHO細胞は、ヒトTGR23-2リガンド (1-20)
に応答し、またこのリガンド濃度依存的な細胞内カルシウム量の上昇を示した。

10

実施例 4 1

ラットTGR23-1およびラットTGR23-5発現ベクターの構築

ラットTGR23-5 (配列番号：9 1) をコードするDNAをQuick change site-
directed mutagenesis キット (Stratagene) を用いて調製した。ラットTGR23-1の
15 DNAに以下のようにしてPCR法により部位特異的変異を導入した。PCR反応液は、5
ngの参考例 4 に記載のpCR2. 1-rTGR23-1、2 mMのdNTPs、0. 4 μ Mの変異導入用フォ
ワードプライマーと変異導入用リバースプライマー [pCR2. 1-rTGR23-5作製用フ
ォワードプライマー (配列番号：1 1 6)、pCR2. 1-rTGR23-5作製用リバースプ
ライマー (配列番号：1 1 7)]、2. 5 unitのpfuポリメラーゼにキットに添付
20 のPCR反応用バッファーを加え、全容量を50 μ lとした。この反応液を、95℃で30
秒間保温し、その後95℃・30秒、55℃・60秒、68℃・10分を18回繰り返す反応に
供した。PCR反応の後、鋳型pCR2. 1-rTGR23-1を分解するため、1 μ lのDpn I (10
unit/ μ l) を反応液に添加し、37℃で1時間保温した。コンピーテント細胞であ
るTOP10 (Invitrogen) を、1 μ lのDpn I反応液でヒートショック法により形質転
25 換した。この形質転換大腸菌からプラスミドDNAをQIAwell 8 Ultra Plasmid kit
(Qiagen) を用いて取得した。塩基配列の決定のための反応はDyeDeoxyTerminator
Cycle Sequence Kit (Applied Biosystems) を用いて行ない、次に、DNAの塩基配
列をABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems) を用いて解析して変異
が導入されていることを確認した。

ラットTGR23-5発現ベクターは、動物細胞発現ベクターpAKK0のSal IサイトとSpe Iサイトに変異の導入が確認されたラットTGR23-5をライゲーションすることにより構築した。DNA配列解析から変異の導入が確認されたプラスミドDNAをSal IとSpe Iで消化し、DNA溶液を1.5% アガロースゲルで電気泳動して5'末端にSal I切断端を、また3'末端にSpe I切断端を持つラットTGR23-5のDNA断片をアガロースゲルからDNA Extraction Kit (Qiagen)を用いて回収した。このDNA断片を、pAKK0のSal IとSpe IサイトにTakara ligation kit ver. 2 (タカラ)を用いて結合させた。コンピーテント細胞である大腸菌 (*Escherichia coli*) DH5 α (トーマーヨーボー) をライゲーション反応液により形質転換して形質転換体を作製し、大腸菌DH5 α /pAKK0-rTGR23-5と命名した。

ラットTGR23-1発現ベクターは、プラスミドpCR2. 1-rTGR23-1をSal IとSpe Iで消化した後、上述のラットTGR23-5と同様にして動物発現ベクターpAKK0のSal IサイトとSpe Iサイトにライゲーションすることによって構築し、コンピーテント細胞である大腸菌 (*Escherichia coli*) DH5 α (トーマーヨーボー) を形質転換して大腸菌DH5 α /pAKK0-rTGR23-1を得た。

実施例 4 2

ラットTGR23-1発現CHO細胞株およびラットTGR23-5発現CHO細胞株の作製

大腸菌DH5 α /pAKK0-rTGR23-1および大腸菌DH5 α /pAKK0-rTGR23-5を培養し、これらの大腸菌体からPlasmid Midi Kit (Qiagen)を用いてプラスミドDNAをそれぞれ調製した。これらのプラスミドDNAをEffectene Transfection Reagent (Qiagen)を用いて添付のプロトコールに従ってCHO dhfr⁻細胞に導入した。2 μ gのプラスミドDNAとトランスフェクション試薬との混合液を48時間前に1 x 10⁵個のCHO dhfr⁻細胞を播種した直径10 cmシャーレに添加した。10%ウシ胎児血清を含むMEM α 培地で1日間培養した後、継代し、選択培地である10%透析ウシ胎児血清を含む核酸不含MEM α 培地で培養した。選択培地中に増殖してくるラットTGR23-1発現CHO細胞およびラットTGR23-5発現CHO細胞のコロニーをそれぞれ30個選択した。

実施例 4 3

TaqMan PCR法を用いたラットTGR23-1発現CHO細胞株およびラットTGR23-5発現CHO細胞株における導入遺伝子発現量の測定

実施例 4 2 で作製したラットTGR23-1発現CHO細胞株およびラットTGR23-5発現
5 CHO細胞株をそれぞれ25 cm²フラスコに培養し、増殖した細胞からRNeasy
Protect Kit (Qiagen)を用いてtotal RNAを調製した。Total RNA を鋳型とした
cDNA合成反応液は、0.5 μgのtotal RNA、25 pmolのランダムノナー(Takara)、
1 mMのdNTPs、1 μlのReverTra Ace (TOYOBO) およびキットに付属の反応バッファ
ーからなり、全容量は20 μlとした。逆転写反応はサーマルサイクラー (Takara
10)を用いて、30℃・10分、次に42℃・60分、最後に99℃・5分の条件で行なった
。

標準ラットTGR23-1部分DNAを、全長ラットTGR23-1 DNAを鋳型としたPCR増幅
DNAを精製することにより調製した。PCR反応液は、680 pgのpCR2.1-TGR23-1 (参
考例 4)、0.2 μMの合成DNAフォワードプライマー (配列番号：118)、0.2 μ
15 Mの合成DNAリバースプライマー (配列番号：119)、0.8 mMのdNTPs、2 μlの
Advantage IIポリメラーゼ (Clontech) および酵素に付属のバッファーからなり
、全容量を100 μlとした。増幅のための反応はサーマルサイクラー (Applied
Biosystems)を用い、95℃・60秒の加熱の後、95℃・20秒、72℃・120秒のサイ
クルを5回、95℃・20秒、70℃・120秒のサイクルを5回、95℃・20秒、68℃・120
20 秒のサイクルを20回繰り返し、最後に68℃・3分間保温した。PCR増幅DNAを
QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)を用いて回収した。この増幅ラット
TGR23-1部分DNA溶液の260 nmの吸収から計算したDNA量と増幅ラットTGR23-1部分
DNA塩基組成からこのDNA溶液に含まれるラットTGR23-1部分DNAのコピー数を算出
した。DNAコピー数が明らかとなったラットTGR23-1部分DNAを標準ラットTGR23-1
25 部分DNAとして定量を目的としたTaqMan PCRに用いた。

ラットTGR23-1発現CHO細胞株およびラットTGR23-5発現CHO細胞株の導入遺伝子発
現コピー数をTaqMan PCR法により決定した。TaqMan PCR反応液は、2 μlの逆転写
cDNA溶液または1 μlの各種濃度の標準ラットTGR23-1部分DNA、0.2 μMの合成DNA
フォワードプライマー (配列番号：120)、0.2 μMの合成DNAリバースプライ

181

マー（配列番号：1 2 1）、0.2 μ MのラットTGR23 TaqManプローブ（配列番号：1 2 2、Fam-ttggagttat ccggtcctct cttccaag-Tamra；配列中、Famは6-carboxy-fluoresceinを、Tamraは6-carboxy-tetramethyl-rhodamine をそれぞれ示す）とTaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) からなり、全容量は25 μ lとした。PCR反応は、ABI PRISM 7700 Sequence Detector System (Applied Biosystems) を用い、50℃・2分、95℃・10分で保温し、次に95℃・15秒、60℃・60秒のサイクルを40回繰り返すことにより行なった。ラットTGR23-1発現CHO細胞株およびラットTGR23-5発現CHO細胞株の導入遺伝子発現量は、ABI PRISM 7700 SDSソフトウェアによって算出した。リポーターの蛍光強度が設定された値に達した瞬間のサイクル数を縦軸にとり、種々の標準ラットTGR23-1部分DNAのコピー数の対数値を横軸にとって標準曲線を作成した。標準曲線から逆転写cDNAに含まれる導入遺伝子の発現コピー数を算出し、total RNA 1ng当たりの導入遺伝子発現量を決定した。ラットTGR23-1 遺伝子高発現細胞株としてクローンNo. 34を、また、ラットTGR23-5遺伝子高発現細胞株としてクローンNo. 29を選択した。

実施例 4 4

FLIPRを用いたラットTGR23-2リガンド（1-18）によるラットTGR23-1発現CHO細胞およびラットTGR23-5発現CHO細胞の細胞内Caイオン濃度上昇活性の測定

ラットTGR23-2リガンド（1-18）を種々の濃度で実施例 5 に記載した方法にしたがってラットTGR23-1発現CHO細胞またはラットTGR23-5発現CHO細胞に投与し、細胞内Caイオン濃度上昇活性をFLIPRを用いて測定した。結果を図 2 7 および図 2 8 に示す。明らかにラットTGR23-1発現CHO細胞およびラットTGR23-5発現CHO細胞はラットTGR23-2リガンド（1-18）に応答し、またこのリガンド濃度依存的な細胞内カルシウム量の上昇を示した。図 2 7 および図 2 8 のグラフから算出した細胞内Caイオン濃度上昇活性におけるラットTGR23-2リガンド（1-18）のラットTGR23-1発現CHO細胞およびラットTGR23-5発現CHO細胞に対するEC₅₀値は、それぞれ0.19 nM（ラットTGR23-1）および14 nM（ラットTGR23-5）であった。

実施例 4 5

飽和結合実験による [Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド (1-20) のラット TGR23-1とラットTGR23-5への結合親和性の比較

- 5 ラットTGR23-1発現CHO細胞またはラットTGR23-5発現CHO細胞から調製したそれぞれの細胞膜画分の [Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド (1-20) に対する結合親和性を以下のようにして測定した。

- 10 初めにラットTGR23-1発現CHO細胞およびラットTGR23-5発現CHO細胞から膜画分を調製した。ラットTGR23-1発現CHO細胞およびラットTGR23-5発現CHO細胞を培養し、この細胞をリン酸緩衝生理食塩水で洗った後、細胞をフラスコからはがして細胞塊を遠心操作により集めた。この細胞塊を細胞破碎バッファー (20 mM Tris-HCl (pH 7.4)、5 mM EDTA、0.5 mM PMSF、0.1 μg/ml pepstatin、20 μg/ml leupeptineおよび 4 μg/ml E-64) に懸濁し、ポリトロンホモジナイザーで破碎した。この細胞破碎液を遠心 (4℃、1000 × g、5分間) に供し、遠心上清を回収した。次に、この遠心上清を超遠心 (4℃、30000 × g、60分間) に供し、
15 沈殿物を膜画分として回収した。この膜画分を細胞破碎バッファーに懸濁して懸濁液のタンパク質濃度を決定した後、この膜画分を実験に使用するまで-80℃で保存した。

- 上記のようにして調製したラットTGR23-1発現CHO細胞膜画分およびラットTGR23-5発現CHO細胞膜画分を結合バッファー (20 mM Tris-HCl (pH 7.4)、5 mM
20 EDTA、0.1 % BSA、0.5 mM PMSF、0.1 μg/ml pepstatin、20 μg/ml leupeptineおよび4 μg/ml E-64) に懸濁して、それぞれ10 μg/ml濃度に調製し、飽和結合実験用膜画分溶液として用いた。これらの膜画分への実施例 2 6に記載の方法により調製した [Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド (1-20) の総結合は、以下の方法によって得た。

- 25 200 μlの飽和結合実験用膜画分溶液に2 μlのジメチルスルホキシド (DMSO) と2 μlの種々の濃度の [Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド (1-20) を添加してよく混合した後、25℃にて90分間 保温した。この膜画分に結合した [Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド (1-20) の反応液をガラスフィルターでろ過することにより非結合 [Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド (1-20) から分離した

。すなわち、反応液を、あらかじめ0.3% のポリエチレンジアミンを含む20 mM Tris-HCl (pH 7.4) バッファーに浸したGF/Fフィルター (Whatman) 上でろ過し、さらにこのグラスフィルターを1.5 mlの氷冷した結合バッファーで3回洗浄した。このグラスフィルター上に捕捉された [Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド

5 (1-20) の放射活性をγ-カウンターにより測定し、この値を総結合とした。一方、これらの膜画分への [Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド (1-20) の非特異的結合は、総結合の反応系において2μlのDMSOの代りに2μlの100μMヒトTGR23-2リガンド (1-20) (配列番号: 23) を用いることにより得た。ある [Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド (1-20) 濃度における特異的結合は、その [Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド (1-20) 濃度における総結合から非特異的結合を減じた値である。

10

上記の飽和結合実験における [Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド (1-20) のラットTGR23-1発現CHO細胞膜画分またはラットTGR23-5発現CHO細胞膜画分への結合様式をスキャチャード法により解析した。横軸には、添加したある [Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド (1-20) 濃度における1 mgタンパク質量の膜画分あたりの [Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド (1-20) 特異的結合量の値をとり、また縦軸には、その時の1 mgタンパク質量の膜画分あたりの [Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド (1-20) 特異的結合量の値を膜画分に結合しない反応液中の [Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド (1-20) 濃度で除した値をとってプロットした。図29および図30に示すように、[Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド (1-20) のラットTGR23-1発現CHO細胞膜画分またはラットTGR23-5発現CHO細胞膜画分への飽和結合実験においてプロットされた点は直線で近似された。このことはラットTGR23-1発現CHO細胞膜画分またはラットTGR23-5発現CHO細胞膜画分に単一の [Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド (1-20) 結合部位がそれぞれ存在することを示した。この実験における、ラットTGR23-1と [Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド (1-20) の解離定数は141±8.71 (pM)、またラットTGR23-1の最大 [Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド (1-20) 結合部位数は1.41±0.04 pmol/mg proteinであった。一方、ラットTGR23-5と [Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド (1-20) の解離定数は125±8.36 (pM)、またラッ

15

20

25

トTGR23-1の最大 [Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド (1-20) 結合部位数は 0.93±0.03 pmol/mg proteinであった。[Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド (1-20) は、ほとんど同じ親和性をもってラットTGR23-1とラットTGR23-5に結合した。

- 5 表 1 にラットTGR23-1およびラットTGR23-5のTGR23-2リガンドに対する親和性およびそれぞれの受容体発現細胞のTGR23-2リガンドによる細胞内Caイオン濃度上昇活性を示した。

- ラットTGR23-5は、TGR23-2リガンドに対してラットTGR23-1とほぼ同程度の高い親和性を有しているにもかかわらず、TGR23-2リガンドに対する応答性は1/100
10 程度であった。このことは、ラットTGR23-5を、ラットTGR23-1、マウスTGR23-BまたはヒトTGR23と同一細胞に共存させることにより、ラットTGR23-1、マウスTGR23-BまたはヒトTGR23のTGR23-2リガンドに対する応答性を減弱させることが可能であることを示唆した。

15 表 1

	ラットTGR23-1	ラットTGR23-5
結合定数	141 pM	125 pM
細胞内Ca上昇活性 (EC ₅₀)	0.19 nM	14 nM

実施例 4 6

TGR23遺伝子発現の抑制による、ヒト結腸がん細胞株のアポトーシス誘発検討

- A T C Cより購入したヒト結腸がん細胞株COL0205を、Invitrogen社のRPMI-
20 1640培地 (25mM HEPES含有) に牛胎仔血清 (ATCC) を10%加えた培地で懸濁し、1 ウェル当たり4000個の細胞密度で96穴コラーゲンタイプIコートプレート (IWAKI社) に播種した。同様にATCCより購入したヒト結腸がん細胞株LS174TをInvitrogen社のEarle's MEM培地に牛胎仔血清 (ATCC) を10%加えた培地で懸濁し、1 ウェル当たり3000個の細胞密度で96穴平底組織培養プレート (BDファルコン社) に播種した。ヒト結腸がん細胞株HCT 116 (ATCC) をInvitrogen社のD-MEM
25 培地 (10mM HEPES含有) に牛胎仔血清 (ATCC) を10%加えた培地で懸濁し、1 ウェル当たり3000個の細胞密度で96穴平底組織培養プレート (BDファルコン社) に播

種した。5%炭酸ガス気流中、37℃で一晩培養した後、アンチセンスオリゴヌクレオチドをトランスフェクションした。

TGR23遺伝子の翻訳領域配列にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチド配列（配列番号：1 2 3）を設計後、phosphorothioate化オリゴヌクレオチドを合成し、HPLC精製して導入実験に用いた（以下、アンチセンスオリゴヌクレオチドと略する）。コントロールとしては、配列番号：1 2 3で示される塩基配列のリバーズ配列（配列番号：1 2 4）を同様にphosphorothioate化し、HPLC精製して用いた（以下、コントロールオリゴヌクレオチドと略する）。

具体的には、COL0205はOpti-MEM I（Invitrogen社）で167倍に希釈した

- 10 FuGENE™6 Transfection Reagent（Roche Diagnostics社）にアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはコントロールオリゴヌクレオチドを加え、混合したオリゴヌクレオチド溶液を、1ウェル当たり65μLの割合でプレートに添加した。オリゴヌクレオチドの終濃度は200nMとなるよう調製した。LS174TはOpti-MEM I（Invitrogen社）で32倍に希釈したLipofectamine™ 2000（Invitrogen社）にOpti-MEM I（Invitrogen社）で希釈したアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはコントロールオリゴヌクレオチドを1:1で加え、混合したオリゴヌクレオチド溶液を、1ウェル当たり50μLの割合でプレートに添加した。オリゴヌクレオチドの終濃度は33nMとなるよう調製した。HCT 116はOpti-MEM I（Invitrogen社）で5倍に希釈したOLIGOFECTAMINE™ Reagent（Invitrogen社）にOpti-MEM I（Invitrogen社）で希釈したアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはコントロールオリゴヌクレオチドを3:8で加え、混合したオリゴヌクレオチド溶液を、1ウェル当たり40μLの割合でプレートに添加した。オリゴヌクレオチドの終濃度は520nMとなるよう調製した。

- 25 上記の条件で更に3日間培養した後、Cell Death Detection ELISA^{PLUS}キット（Roche Diagnostics社）を用いて添付プロトコルに従い、上記オリゴヌクレオチドのアポトーシス誘導活性を測定した。

その結果、アンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号：1 2 3）は陰性対照として用いたコントロールオリゴヌクレオチド（配列番号：1 2 4）に比べてCOL0205、LS174Tでそれぞれ約1.6倍、約1.3倍のアポトーシス誘導活性を示し、

統計学的に有意な差 (COL0205では $P \leq 0.05$ 、LS174Tでは $P \leq 0.01$) を示した (表 2、3)。また、TGR23を発現していないHCT 116では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、陰性対照として用いたコントロールオリゴヌクレオチドに比べて有意なアポトーシス誘導活性を示さなかった (表 4)。

5

表 2

COL0205		アポトーシス誘導活性 ($A_{405} - A_{492}$)	
		平均値	標準偏差
10	ブランク	0.23	0.012
	コントロールオリゴヌクレオチド	0.52	0.046
	アンチセンスオリゴヌクレオチド	0.83	0.11

表 3

15

LS174T		アポトーシス誘導活性 ($A_{405} - A_{492}$)	
		平均値	標準偏差
20	ブランク	0.43	0.016
	コントロールオリゴヌクレオチド	0.88	0.0099
	アンチセンスオリゴヌクレオチド	1.1	0.024

表 4

HCT 116		アポトーシス誘導活性 ($A_{405} - A_{492}$)	
		平均値	標準偏差
25	ブランク	0.59	0.054
	コントロールオリゴヌクレオチド	0.72	0.026
	アンチセンスオリゴヌクレオチド	0.68	0.10

実施例 4 7

アンチセンスオリゴヌクレオチド投与によるTGR23遺伝子の発現量低下の検討

- 実施例 4 6 で用いたヒト結腸がん細胞株COL0205およびLS174Tを実施例 4 6 と同様の培地に懸濁し、1 ウェル当たりCOL0205は24,000個の細胞密度で24穴コーゲンタイプIコートプレート（IWAKI社）に、LS174Tは18,000個の細胞密度で24穴平底組織培養プレート（BDファルコン社）に播種した。5%炭酸ガス気流中、37℃で一晩培養した後、実施例 4 6 の方法に準じて、実施例 4 6 で使用したアンチセンスオリゴヌクレオチドおよびコントロールオリゴヌクレオチドをトランスフェクションした。但し、オリゴヌクレオチド溶液の添加量は1 ウェル当たり、COL0205は390 μ L、LS174Tは300 μ Lとした。トランスフェクション後、5%炭酸ガス気流中、37℃で24時間培養を継続した後にRNeasy Mini Total RNA Kit（QIAGEN社）を用いてtotal RNAを抽出した。ここで得られたtotal RNAを鋳型として、TaqMan Reverse Transcription Reagents（Applied Biosystems社）を用いて添付プロトコールに従い逆転写反応した。次に、TaqMan Universal PCR Master Mix（Applied Biosystems社）を用いて、total RNAにして1.5ng～3ngに相当するcDNAを鋳型とし、2種類のプライマー（配列番号：9 および配列番号：10）を各500 nM、FAM標識したプローブ（配列番号：11）を100 nMになるように加え、TGR23遺伝子の発現コピー数を測定した。PCR反応は、50℃2分、95℃10分の後、95℃15秒、60℃1分のサイクルを40回繰り返した。アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびコントロールオリゴヌクレオチドをトランスフェクションしない場合にはTGR23遺伝子発現量はtotal RNA 1ng当たりCOL0205では620コピー、LS174Tでは290コピーであったのに対し、アンチセンスオリゴヌクレオチド投与群ではCOL0205で210コピー、LS174Tでは150コピーであり統計学的に有意（COL0205では $P \leq 0.01$ 、LS174Tでは $P \leq 0.05$ ）な発現量低下が認められた。一方、陰性対照として用いたコントロールオリゴヌクレオチド投与群ではCOL0205で590コピー、LS174Tでは280コピーであり非トランスフェクション群と比べて統計学的に有意な発現量低下は認められなかった。

この結果より、TGR23遺伝子発現量の低下により、ヒト結腸がん細胞株のアポトーシスが誘発されたことが示された。

実施例 4 8

[Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド (1-20) およびヒトTGR23-2発現CHO細胞膜画分を用いたヒトTGR23-2に結合する化合物のスクリーニング法

- 5 実施例 2 6 に記載した方法によって作製した [Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド (1-20) および実施例 2 4 に記載した方法によってヒトTGR23-2発現CHO細胞から調製したヒトTGR23-2発現CHO細胞膜画分を用いたヒトTGR23に結合する化合物のスクリーニングを以下のようにして実施する。

- ヒトTGR23-2発現CHO細胞から調製した細胞膜画分を膜画分濃度が1 μ g/mlとなるようアッセイ用バッファー (20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 0.1% BSA, 0.5 mM PMSF, 1 μ g/ml ペプスタチン, 4 μ g/ml E-64, 20 μ g/ml ロイペプチン, pH 7.4) で希釈後、ポリプロピレン製試験管 (Falcon 2053) に200 μ lずつ分注する。最大結合量 (TB) を測定するために、2 μ lのDMSOと10 nMの [Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド (1-20) 2 μ lを膜画分溶液に添加する。また、非特異的結合を測定するために、1 μ Mの [Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド (1-20) のDMSO溶液2 μ lと10 nMの [Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド (1-20) 2 μ lを膜画分溶液に添加する。さらに、試験化合物のヒトTGR23に対する結合活性を調べるために種々の濃度の試験化合物のDMSO溶液2 μ lと10 nMの [Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド (1-20) 2 μ lを膜画分溶液に添加する。25 $^{\circ}$ Cで90分間反応させた後、ポリエチレンイミン処理したワットマングラスフィルター (GF-F) を用いて反応液を吸引ろ過する。ろ過後、 γ -カウンターを用いて濾紙上に残った放射活性を測定する。最大結合量から非特異的結合量を引いた値を特異的結合量 (SB) として見積もる。試験化合物のヒトTGR23に対する結合阻害活性 (阻害率 (%)) は、最大結合量から試験化合物および [Nle¹⁰, ¹²⁵I-Tyr¹⁵] ヒトTGR23-2リガンド (1-20) を加えたときに濾紙上に残った放射活性 (X) を減じた値の特異的結合量に対する比率 ((TB-X)/SB x 100 (%)) で示される。種々の濃度における試験化合物の結合阻害率を比較することによってより低濃度で強い結合阻害活性を示す化合物をヒトTGR23に結合する能力の高い化合物として選択する。

上記のようにして選択されたヒトTGR23に結合する化合物について、実施例 3

- 、実施例 4 または実施例 5 に記載した方法で TGR23-2 発現 CHO 細胞に対する細胞内 cAMP 産生促進活性（実施例 3）、アラキドン酸代謝産物遊離促進活性（実施例 4）または細胞内 Ca^{2+} 放出促進活性（実施例 5）を測定し、いずれかの活性を示す化合物を TGR23 アゴニストであると判定する。また、いずれの活性も示さなかった化合物については、TGR23-2 リガンドと共存させて上記の実施例 3、実施例 4 または実施例 5 に記載した活性測定を実施し、TGR23-2 リガンドの示す活性に対して阻害活性を示した化合物を TGR23 アンタゴニストであると判定する。

産業上の利用可能性

- 10 本発明のポリペプチド、本発明のレセプター、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターをコードする本発明のポリヌクレオチド、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターに対する本発明の抗体、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの本発明のアンチセンスポリヌクレオチドなどは、（i）本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターが関与する各種疾病の治療・予防剤、（ii）本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの活性を促進または阻害する化合物（例、本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物）、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの発現を促進または阻害する化合物、またはその塩のスクリーニング、（iii）本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの定量、（iv）本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの遺伝子診断薬、（v）アンチセンス DNA を含有する医薬、（vi）本発明の抗体を含有する医薬、（vii）本発明の DNA を含有する非ヒト動物の作出、（viii）本発明の DNA が不活性化された非ヒト動物の作出、（ix）構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較にもとづいたドラッグデザインなどの実施のために有用である。
- 25 本発明のポリペプチド、本発明のレセプター、本発明のポリヌクレオチド、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの活性を促進する化合物またはその塩、および本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの発現を促進する化合物またはその塩は、例えば肥満症（例、悪性肥満細胞症、外因性肥満、過インシュリン性肥満症、過血漿性肥満、下垂体性肥満、減血漿性肥満症、甲状腺機

190

能低下肥満症、視床下部性肥満、症候性肥満症、小児肥満、上半身肥満、食事性肥満症、性機能低下性肥満、全身性肥満細胞症、単純性肥満、中心性肥満など）、摂食亢進症などの予防・治療剤などの低毒性で安全な医薬として有用である。

- 本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの活性を促進する化合物または
- 5 はその塩、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプターの発現を促進する化合物またはその塩、本発明の抗体（中和抗体）、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、例えば癌（例、大腸癌、結腸癌、直腸癌、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、子宮頸部癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）の
- 10 予防・治療剤、摂食（食欲）促進剤、拒食症の予防・治療剤、アポトーシス誘導剤などの低毒性で安全な医薬として有用である。

191

請求の範囲

1. 配列番号：1 または配列番号：3 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩と結合する能力を有することを特徴とするポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
- 5 2. 配列番号：22、配列番号：14 または配列番号：31 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する請求項1記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
3. 配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23、配列番号：49、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：36、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31 または配列番号：32 で表されるアミノ酸配列を含有する請求項2記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
- 10 4. 配列番号：62 で表されるアミノ酸配列を含有する請求項2記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
- 15 5. 標識した請求項4記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
6. 配列番号：19、配列番号：28 または配列番号：61 で表されるアミノ酸配列を含有する請求項2記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
- 20 7. 請求項1記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
8. 配列番号：41、配列番号：42、配列番号：43、配列番号：44、配列番号：37、配列番号：38、配列番号：39、配列番号：40、配列番号：45、配列番号：46、配列番号：47、配列番号：48 または配列番号：50 で表される塩基配列を含有する請求項7記載のポリヌクレオチド。
- 25 9. 配列番号：18、配列番号：27 または配列番号：60 で表される塩基配列を含有する請求項7記載のポリヌクレオチド。
10. DNAである請求項7～9記載のポリヌクレオチド。

- 1 1. 請求項 7 記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。
- 1 2. 請求項 1 1 記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。
- 1 3. 請求項 1 2 記載の形質転換体を培養し、請求項 1 記載のポリペプチドを生成・蓄積せしめることを特徴とする請求項 1 記載のポリペプチド、そのアミドも
- 5 しくはそのエステルまたはその塩の製造法。
- 1 4. 請求項 1 記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる医薬。
- 1 5. 請求項 7 記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。
- 1 6. 請求項 7 記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断薬。
- 10 1 7. 肥満症の予防・治療剤である請求項 1 4 または請求項 1 5 記載の医薬。
- 1 8. 肥満症の診断薬である請求項 1 6 記載の診断薬。
- 1 9. 請求項 1 記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体。
- 2 0. 請求項 1 9 記載の抗体を含有してなる医薬。
- 15 2 1. 請求項 1 9 記載の抗体を含有してなる診断薬。
- 2 2. 癌の予防・治療剤である請求項 2 0 記載の医薬。
- 2 3. 摂食促進剤である請求項 2 0 記載の医薬。
- 2 4. 癌の診断薬である請求項 2 1 記載の診断薬。
- 2 5. 請求項 7 記載のポリヌクレオチドに相補的または実質的に相補的な塩基配
- 20 列またはその一部を有するポリヌクレオチド。
- 2 6. DNA である請求項 2 5 記載のポリヌクレオチド。
- 2 7. 請求項 2 5 記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。
- 2 8. 癌の予防・治療剤である請求項 2 7 記載の医薬。
- 2 9. 摂食促進剤である請求項 2 7 記載の医薬。
- 25 3 0. 請求項 1 記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする請求項 1 記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
- 3 1. 標識した請求項 1 記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステル

またはその塩を用いる請求項 30 記載のスクリーニング方法。

32. 請求項 5 記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いる請求項 30 記載のスクリーニング方法。

5 33. さらに、配列番号：1 または配列番号：3 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いる請求項 30 記載のスクリーニング方法。

34. さらに、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：63、配列番号：65、配列番号：95、配列番号：97、配列番号：77、配列番号：85、配列番号：87、配列番号：89、配列番号：91、配列番号：93、配列番号：71、配列番号：75、配列番号：83、配列番号：51、配列番号：55、配列番号：69、配列番号：102 または配列番号：104 で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いる請求項 30 記載のスクリーニング方法。

15 35. 配列番号：3 で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いる請求項 33 記載のスクリーニング方法。

36. 標識した請求項 1 記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、および配列番号：3 で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いる請求項 30 記載のスクリーニング方法。

20 37. 請求項 5 記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、および配列番号：3 で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いる請求項 30 記載のスクリーニング方法。

38. (i) 請求項 1 記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と、配列番号：1 または配列番号：3 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩とを接触させた場合と、

(ii) 請求項 1 記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と、配列番号：1 または配列番号：3 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩および試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする請求項 30 記載のスクリーニング方法。

39. (i) 請求項 1 記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を、配列番号：1 または配列番号：3 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有する細胞に接触させた場合と、

(ii) 請求項 1 記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩および試験化合物を、配列番号：1 または配列番号：3 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有する細胞に接触させた場合における、該ポリペプチドの該細胞に対する結合量または細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とする請求項 38 記載のスクリーニング方法。

40. (i) 請求項 1 記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を、配列番号：1 または配列番号：3 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有する細胞の膜画分に接触させた場合と、

(ii) 請求項 1 記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩および試験化合物を、配列番号：1 または配列番号：3 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有する細胞の膜画分に接触させた場合における、該ポリペプチドの該細胞の膜画分に対する結合量または細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とする請求項 38 記載のスクリーニング方法。

4 1. (i) 請求項 1 記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を、請求項 1 2 記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したタンパク質に接触させた場合と、

5 (ii) 請求項 1 記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩および試験化合物を、請求項 1 2 記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したタンパク質に接触させた場合における、該ポリペプチドの該タンパク質に対する結合量または細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とする請求項 3 8 記載のスクリーニング方法。

10 4 2. 標識した請求項 1 記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いる請求項 3 8 ~ 4 1 記載のスクリーニング方法。

4 3. 請求項 1 記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる請求項 1 記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

15 4 4. 標識した請求項 1 記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有する請求項 4 3 記載のスクリーニング用キット。

4 5. 請求項 5 記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有する請求項 4 3 記載のスクリーニング用キット。

20 4 6. さらに、配列番号：1 または配列番号：3 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有する請求項 4 3 記載のスクリーニング用キット。

25 4 7. さらに、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：6 3、配列番号：6 5、配列番号：9 5、配列番号：9 7、配列番号：7 7、配列番号：8 5、配列番号：8 7、配列番号：8 9、配列番号：9 1、配列番号：9 3、配列番号：7 1、配列番号：7 5、配列番号：8 3、配列番号：5 1、配列番号：5 5、配列番号：6 9、配列番号：1 0 2 または配列番号：1 0 4 で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有する請求項 4 3 記載のスクリーニング用キット。

48. 配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有する請求項46記載のスクリーニング用キット。

5 49. 標識した請求項1記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、および配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有する請求項43記載のスクリーニング用キット。

10 50. 請求項5記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、および配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有する請求項43記載のスクリーニング用キット。

15 51. 配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有する細胞を含有することを特徴とする請求項46記載のスクリーニング用キット。

52. 配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有する細胞の膜画分を含有することを特徴とする請求項46記載のスクリーニング用キット。

20 53. 請求項12記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したタンパク質を含有することを特徴とする請求項46記載のスクリーニング用キット。

25 54. 請求項30記載のスクリーニング方法または請求項43記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる請求項1記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩。

55. 請求項30記載のスクリーニング方法または請求項43記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる請求項1記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩。

56. 請求項54記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。

- 5 7. 請求項 5 5 記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。
- 5 8. 肥満症の予防・治療剤である請求項 5 6 記載の医薬。
- 5 9. 癌の予防・治療剤である請求項 5 7 記載の医薬。
- 6 0. 摂食促進剤である請求項 5 7 記載の医薬。
- 5 6 1. 配列番号：6 3、配列番号：6 5、配列番号：9 5、配列番号：1 0 2 または配列番号：1 0 4 で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩。
- 6 2. 請求項 6 1 記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩。
- 6 3. 請求項 6 2 記載のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
- 10 6 4. DNA である請求項 6 3 記載のポリヌクレオチド。
- 6 5. 配列番号：6 4、配列番号：6 6、配列番号：9 6、配列番号：9 9、配列番号：1 0 0、配列番号：1 0 3 または配列番号：1 0 5 で表される塩基配列を含有する請求項 6 4 記載のポリヌクレオチド。
- 15 6 6. 配列番号：1 0 1 で表される塩基配列を含有するポリヌクレオチド。
- 6 7. 配列番号：8 5、配列番号：8 7、配列番号：8 9、配列番号：9 1 または配列番号：9 3 で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩。
- 6 8. 請求項 6 7 記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩。
- 20 6 9. 請求項 6 7 記載のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
- 7 0. DNA である請求項 6 9 記載のポリヌクレオチド。
- 7 1. 配列番号：8 6、配列番号：8 8、配列番号：9 0、配列番号：9 2 または配列番号：9 4 で表される塩基配列を含有する請求項 7 0 記載のポリヌクレオチド。
- 25 7 2. 配列番号：7 5 または配列番号：8 3 で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩。
- 7 3. 請求項 7 2 記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩。
- 7 4. 請求項 7 2 記載のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌ

クレオチドを含有するポリヌクレオチド。

75. DNAである請求項74記載のポリヌクレオチド。

76. 配列番号：76または配列番号：84で表される塩基配列を含有する請求項75記載のポリヌクレオチド。

- 5 77. 請求項63、請求項69または請求項74記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

78. 請求項70記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

79. 請求項78記載の形質転換体を培養し、請求項61、請求項67もしくは請求項71記載のタンパク質またはその部分ペプチドを生成・蓄積せしめることを特徴とする請求項61、請求項67もしくは請求項71記載のタンパク質またはその部分ペプチドまたはその塩の製造法。
- 10

80. 請求項61、請求項67もしくは請求項71記載のタンパク質またはその部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬。

81. 請求項63、請求項66、請求項69または請求項74記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。
- 15

82. 請求項63、請求項66、請求項69または請求項74記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断薬。

83. 肥満症の予防・治療剤である請求項80または請求項81記載の医薬。

84. 肥満症の診断薬である請求項82記載の診断薬。

- 20 85. 配列番号：1もしくは配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：51、配列番号：55もしくは配列番号：69で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質、もしくはその部分ペプチド、またはその塩を含有してなる肥満症の予防・治療剤。

- 25 86. 配列番号：1もしくは配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：51、配列番号：55もしくは配列番号：69で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質、もしくはその部分ペプチド、またはその塩をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを含有してなる肥満症の予防・治療剤。

87. 配列番号：1もしくは配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：51、配列番号：55もしくは配列番号：69で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質、もしくはその部分ペプチド、またはその塩をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを含有してなる肥満症の診断薬。
88. 請求項61、請求項67もしくは請求項71記載のタンパク質またはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。
89. 請求項88記載の抗体を含有してなる医薬。
90. 請求項88記載の抗体を含有してなる診断薬。
91. 癌の予防・治療剤である請求項89記載の医薬。
92. 摂食促進剤である請求項89記載の医薬。
93. 癌の診断薬である請求項90記載の診断薬。
94. 配列番号：1もしくは配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：51、配列番号：55もしくは配列番号：69で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質、もしくはその部分ペプチド、またはその塩に対する抗体を含有してなる癌の予防・治療剤。
95. 配列番号：1もしくは配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：51、配列番号：55もしくは配列番号：69で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質、もしくはその部分ペプチド、またはその塩に対する抗体を含有してなる摂食促進剤。
96. 配列番号：1もしくは配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：51、配列番号：55もしくは配列番号：69で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質、もしくはその部分ペプチド、またはその塩に対する抗体を含有してなる癌の診断薬。
97. 請求項63、請求項66、請求項69または請求項74記載のポリヌクレオチドに相補的または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有するポリヌ

クレオチド。

98. DNAである請求項97記載のポリヌクレオチド。

99. 請求項97記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。

100. 癌の予防・治療剤である請求項99記載の医薬。

5 101. 摂食促進剤である請求項99記載の医薬。

102. 配列番号：1もしくは配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：51、配列番号：55もしくは配列番号：69で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質、もしくはその部分ペプチド、またはその塩をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドに、相補的または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有するポリヌクレオチドを含有してなる癌の予防・治療剤。

103. 配列番号：1もしくは配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：51、配列番号：55もしくは配列番号：69で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質、もしくはその部分ペプチド、またはその塩をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドに、相補的または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有するポリヌクレオチドを含有してなる摂食促進剤。

104. 請求項7記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする請求項1記載のポリペプチドの遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

105. 請求項7記載のポリヌクレオチドを含有することを特徴とする請求項1記載のポリペプチドの遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

106. 請求項104記載のスクリーニング方法または請求項105記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる請求項1記載のポリペプチドの遺伝子の発現を促進する化合物またはその塩。

107. 請求項104記載のスクリーニング方法または請求項105記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる請求項1記載のポリペプチドの遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩。

201

- 1 0 8. 請求項 1 0 6 記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。
- 1 0 9. 請求項 1 0 7 記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。
- 1 1 0. 肥満症の予防・治療剤である請求項 1 0 8 記載の医薬。
- 1 1 1. 癌の予防・治療剤である請求項 1 0 9 記載の医薬。
- 5 1 1 2. 摂食促進剤である請求項 1 0 9 記載の医薬。
- 1 1 3. 外来性の請求項 1 0 記載のポリヌクレオチドまたはその変異DNAを有するトランスジェニック非ヒト哺乳動物。
- 1 1 4. 非ヒト動物がゲッ歯動物である請求項 1 1 3 記載の動物。
- 1 1 5. ゲッ歯動物がマウスまたはラットである請求項 1 1 4 記載の動物。
- 10 1 1 6. 外来性の請求項 1 0 記載のポリヌクレオチドまたはその変異DNAを含有し、非ヒト動物において発現しうる組換えベクター。
- 1 1 7. 請求項 1 1 3 記載の動物を用いることを特徴とする請求項 1 0 記載のポリヌクレオチドの欠損・損傷に起因する疾病に対して効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
- 15 1 1 8. 請求項 1 0 記載のポリヌクレオチドが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞。
- 1 1 9. ポリヌクレオチドがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化された請求項 1 1 8 記載の胚幹細胞。
- 1 2 0. 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である請求項 1 1 9 記載の胚幹細胞。
- 20 1 2 1. 請求項 1 0 記載のポリヌクレオチドが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物。
- 1 2 2. ポリヌクレオチドがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が請求項 1 0 記載のポリヌクレオチドに対するプロモーターの制御下で発現しうる請求項 1 2 1 記載の非ヒト哺乳動物。
- 25 1 2 3. 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である請求項 1 2 1 記載の非ヒト哺乳動物。
- 1 2 4. ゲッ歯動物がマウスまたはラットである請求項 1 2 3 記載の動物。
- 1 2 5. 請求項 1 2 2 記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする請求項 1 0 記載のポリヌクレオチドに対するプ

202

ロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

1 2 6. 請求項 1 2 1 記載の動物を用いることを特徴とする肥満の予防・治療剤のスクリーニング方法。

- 5 1 2 7. 請求項 6 3、請求項 6 9 または請求項 7 4 記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする請求項 6 1、請求項 6 7 または請求項 7 2 記載のタンパク質の遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

- 10 1 2 8. 請求項 6 3、請求項 6 9 または請求項 7 4 記載のポリヌクレオチドを含有することを特徴とする請求項 6 1、請求項 6 7 または請求項 7 2 記載のタンパク質の遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

- 15 1 2 9. 請求項 1 2 7 記載のスクリーニング方法または請求項 1 2 8 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる請求項 6 1、請求項 6 7 または請求項 7 2 記載のタンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の発現を促進する化合物またはその塩。

- 20 1 3 0. 請求項 1 2 7 記載のスクリーニング方法または請求項 1 2 8 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる請求項 6 1、請求項 6 7 または請求項 7 2 記載のタンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の発現を阻害する化合物またはその塩。

1 3 1. 請求項 1 2 9 記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。

1 3 2. 請求項 1 3 0 記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。

1 3 3. 肥満症の予防・治療剤である請求項 1 3 1 記載の医薬。

1 3 4. 癌の予防・治療剤である請求項 1 3 2 記載の医薬。

- 25 1 3 5. 摂食促進剤である請求項 1 3 2 記載の医薬。

1 3 6. 外来性の請求項 6 4、請求項 7 0 または請求項 7 5 記載のポリヌクレオチドまたはその変異 DNA を有するトランスジェニック非ヒト哺乳動物。

1 3 7. 非ヒト動物がゲッ歯動物である請求項 1 3 6 記載の動物。

1 3 8. ゲッ歯動物がマウスまたはラットである請求項 1 3 7 記載の動物。

1 3 9. 外来性の請求項 6 4、請求項 7 0 または請求項 7 5 記載のポリヌクレオチドまたはその変異 DNA を含有し、非ヒト動物において発現しうる組換えベクター。

5 1 4 0. 請求項 1 3 6 記載の動物を用いることを特徴とする請求項 6 4、請求項 7 0 または請求項 7 5 記載のポリヌクレオチドの欠損・損傷に起因する疾病に対して効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

1 4 1. 配列番号：1、配列番号：3、配列番号：6 3、配列番号：6 5、配列番号：9 5、配列番号：9 7、配列番号：1 0 2、配列番号：1 0 4、配列番号：7 7、配列番号：8 5、配列番号：8 7、配列番号：8 9 または配列番号：7
10 5 で表わされるアミノ酸配列の第 1 6 0 番目の G l u の直前に一アミノ酸が挿入されたアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩。

1 4 2. 一アミノ酸がアラニンである請求項 1 4 1 記載のタンパク質またはその塩。

1 4 3. 請求項 1 4 1 記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩。

15 1 4 4. 請求項 1 4 1 もしくは請求項 1 4 2 記載のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。

1 4 5. 請求項 1 4 1 記載のタンパク質もしくはその部分ペプチド、またはその塩を含有してなる癌の予防・治療剤。

20 1 4 6. 配列番号：8 3、配列番号：9 1 または配列番号：9 3 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質もしくはその部分ペプチド、またはその塩を含有してなる請求項 1 4 5 記載の予防・治療剤。

1 4 7. 請求項 1 4 4 記載のポリヌクレオチドを含有してなる癌の予防・治療剤。

25 1 4 8. 哺乳動物に対して、請求項 5 4 記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする肥満症の予防・治療方法。

1 4 9. 哺乳動物に対して、請求項 5 5 記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする癌の予防・治療方法。

1 5 0. 肥満症の予防・治療剤を製造するための請求項 5 4 記載の化合物またはその塩の使用。

204

1 5 1. 癌の予防・治療剤を製造するための請求項 5 5 記載の化合物またはその塩の使用。

1 5 2. 請求項 1 記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩を含有してなる肥満症の予防・治療剤。

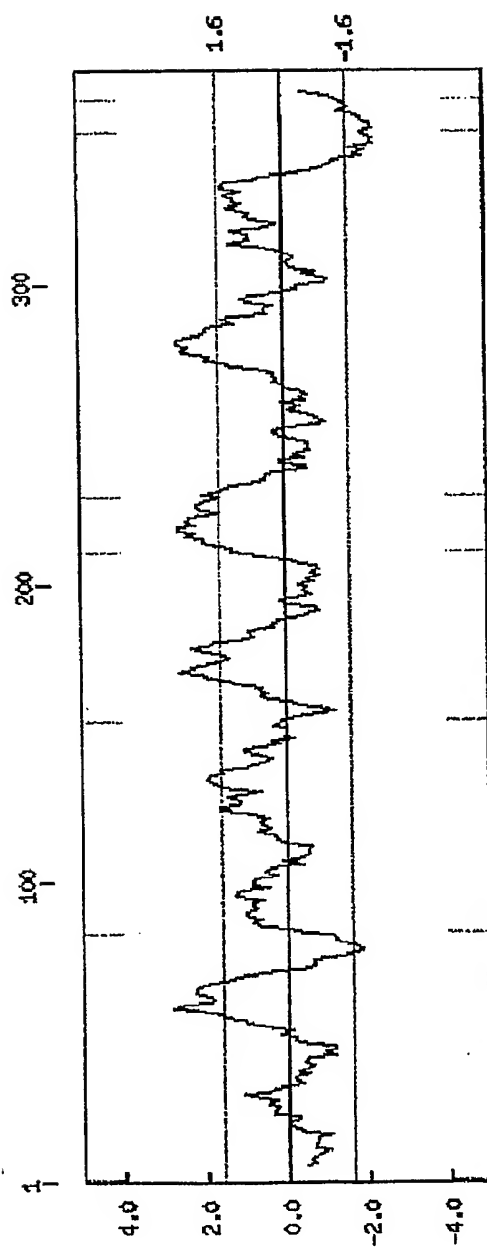
1 5 3. 請求項 1 記載のポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる癌の予防・治療剤、摂食促進剤またはアポトーシス誘導剤。

1 5 4. (1) 配列番号：1 もしくは配列番号：3 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：5 1、配列番号：5 5 もしくは配列番号：6 9 で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質、もしくはその部分ペプチド、またはその塩をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドに、相補的または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有するポリヌクレオチド、(2) 上記タンパク質、もしくはその部分ペプチド、またはその塩に対する抗体、(3) 請求項 1 4 1 記載のタンパク質もしくはその部分ペプチド、またはその塩、または(4) 請求項 1 4 4 記載のポリヌクレオチドを含有してなるアポトーシス誘導剤。

1 5 5. アポトーシス誘導剤である請求項 2 0、請求項 2 7、請求項 5 7、請求項 8 9 または請求項 9 9 記載の医薬。

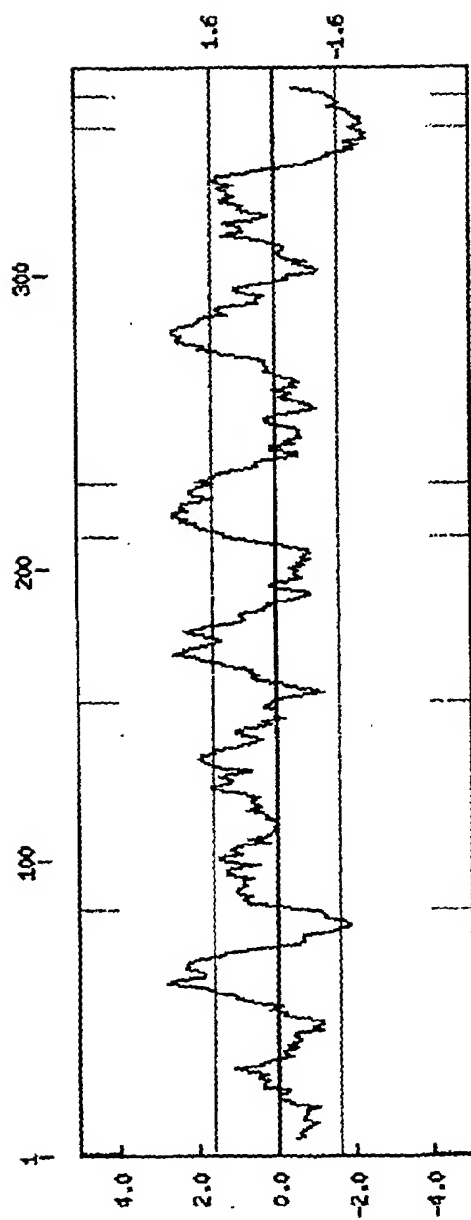
1/30

図1



2/30

2



3/30

3

MPANFTEGSDSSGTGQTLDDSPVACTETVTFTEVEGKSWGSEFYISFKTEQLITLWVLFVFTIVGNSVVLFWSTW
 RRRKKSRMTFFVTQLAITDSFTGLVNILTDINWRFTGDFAPDLVCRVVRVYLQVWLLYASTYVLVSLSIDRYHAI
 VYPMKFLQGEKQARVLIVIAWSLSFLFSIPTLIIIFGKRTLNGEVQCWALWPDDSYWTPYMTIVAFVLVYFIPLTI
 ISIMYGIVIRTIWIKSKTYETVISNCSDGKLCSSYNRGLISKAKIKAYSIIILAFICCWSPYFLFDILDNFN
 LLPDTQERFYASVLIQNLPAI NSAINPLIYCYFSSSISFPCEQSRQSDSRMTFRERTERHEMQILSKPEFI

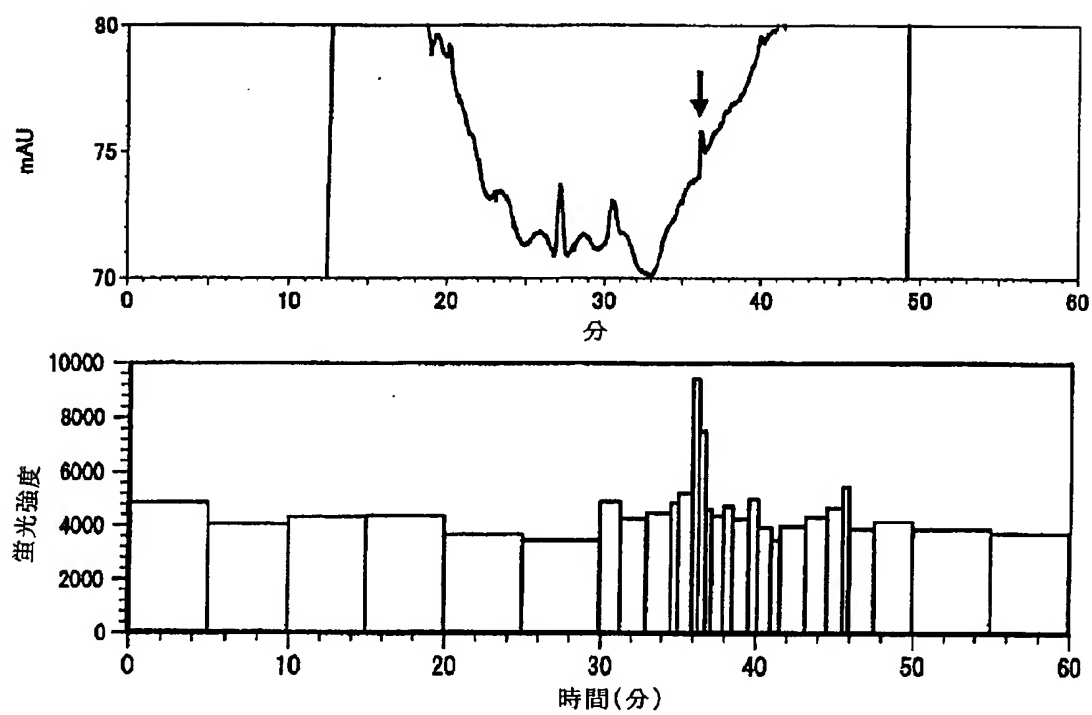
4/30

図4

MPANFTEGSFDSSGTGQTLDSPPVACTETVTFTVEVEGKEWGSFYYSFKTEQLITLWVLFVFTIVGNSVVLFSIW
RRKKSRMTFFVTQLAITDSFTGLVNILTDIIWRFTGDTAPDLVCRVWRYLQVWLLYASTYVLVSLSIDRYHAI
VYPMKFLQGEKQARVLIIVIAWSLSFLFSIPTLLIIFGKRILSNGEVQCWALWPDDSYWTPYMTIVAFVLVYFIPLTI
ISIMYGIVIRTIWIKSKTYETVISNCSDGKLCSSVNRGLISKAKIKAIKYSIIIIILAFICCWSPYFLFDILDNFN
LLPDTQERFYASVIIQNLPALNSA INPLIYCVFSSSISFPCRERRSQDSRMTFRTERHEMQILSKPEFI

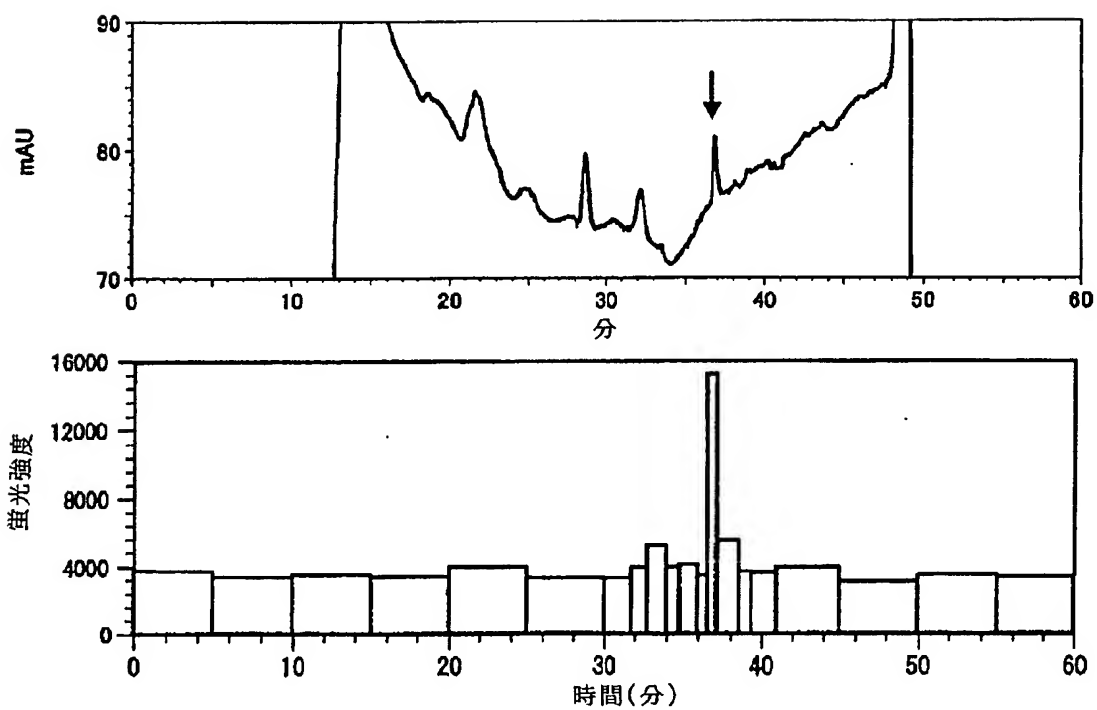
5/30

図5



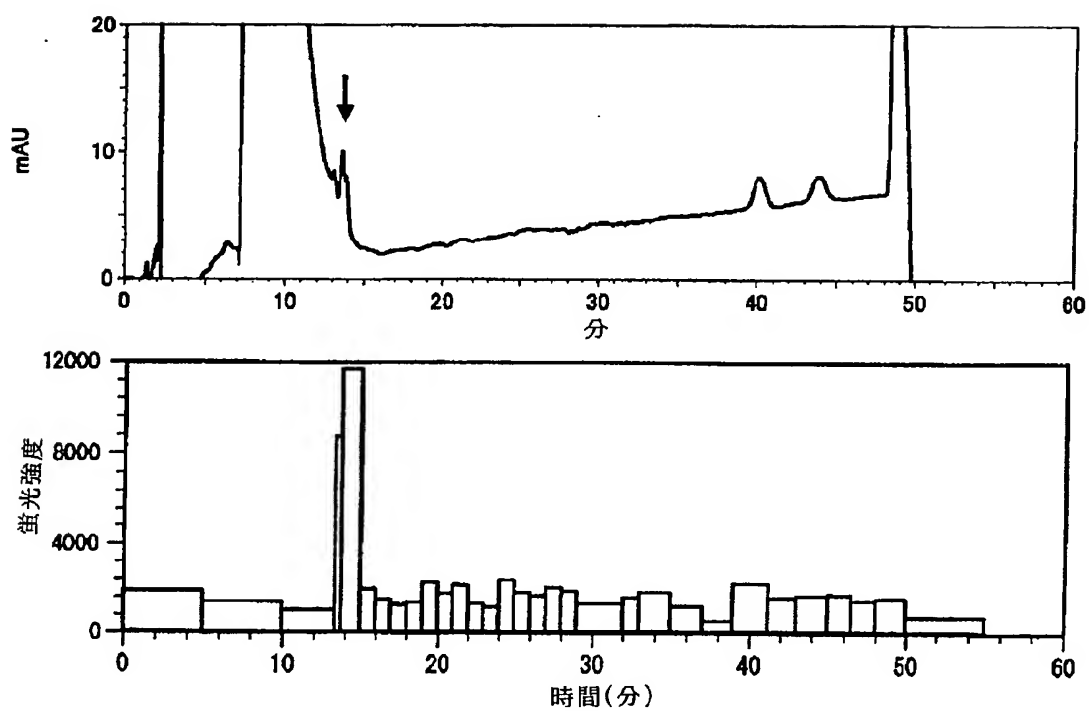
6/30

図6



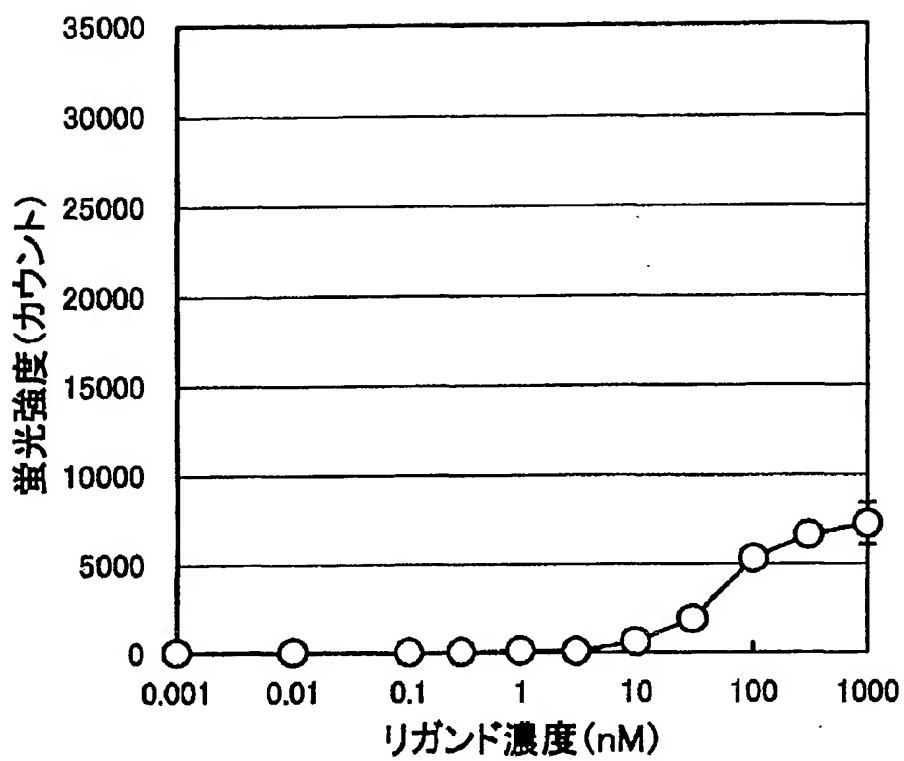
7/30

図7



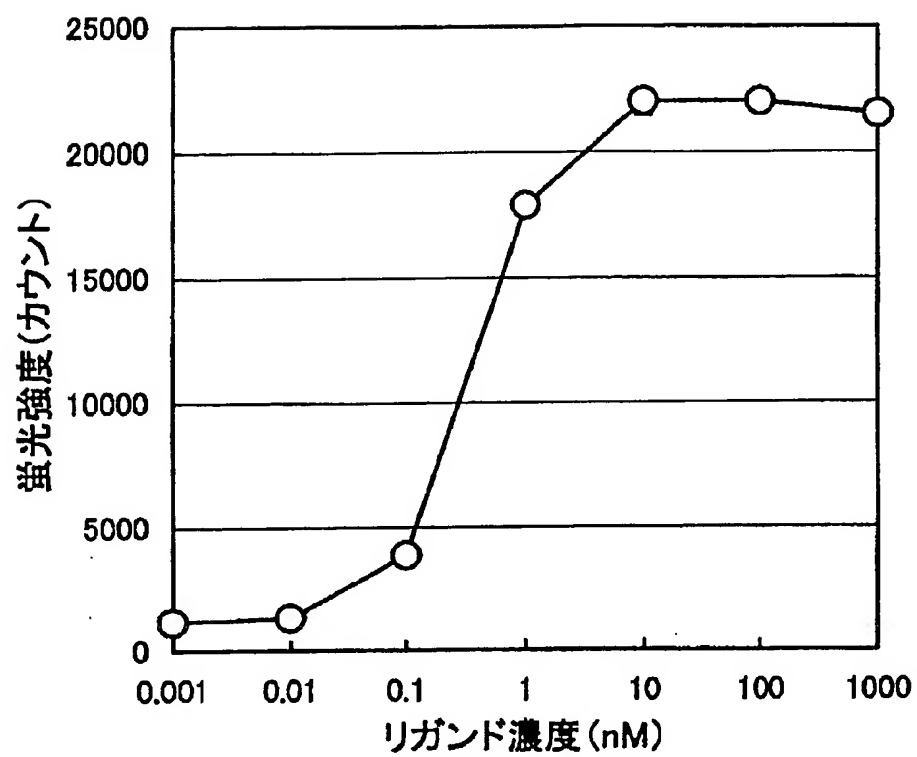
8/30

図8



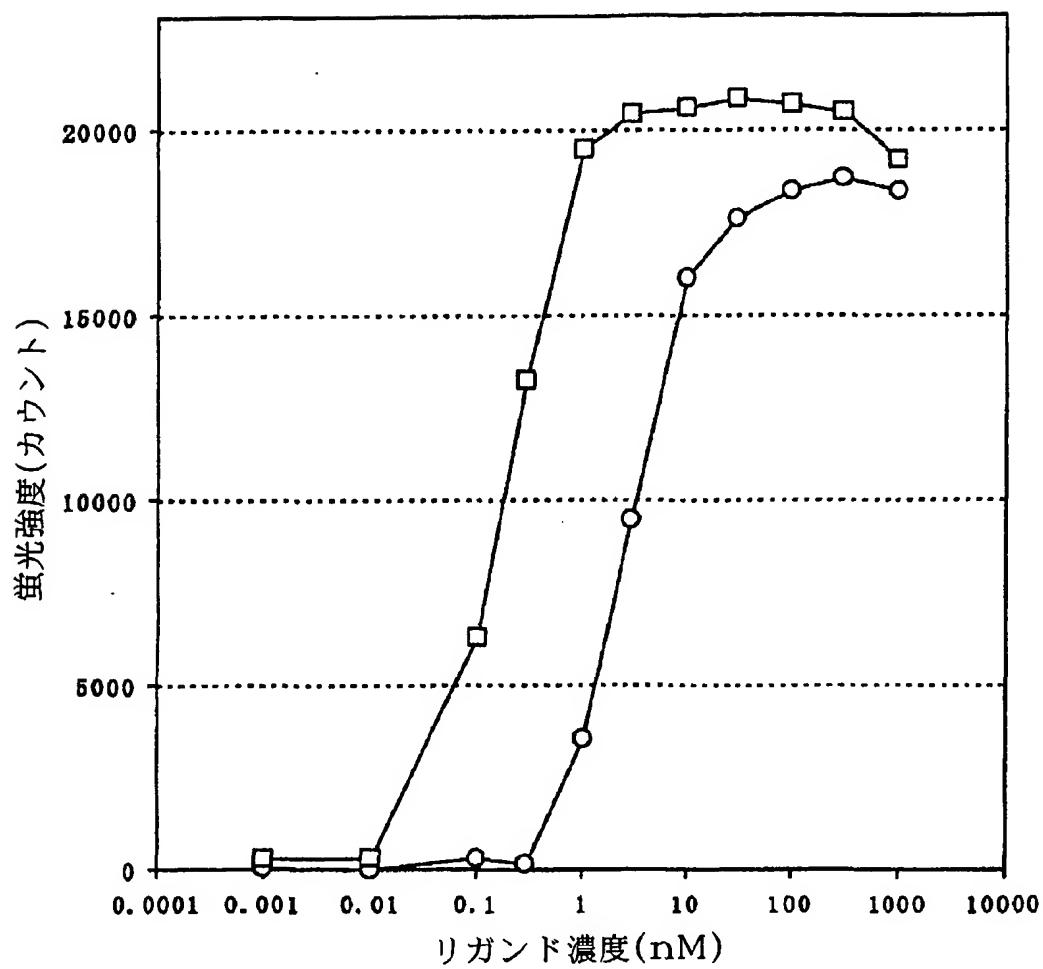
9/30

図9



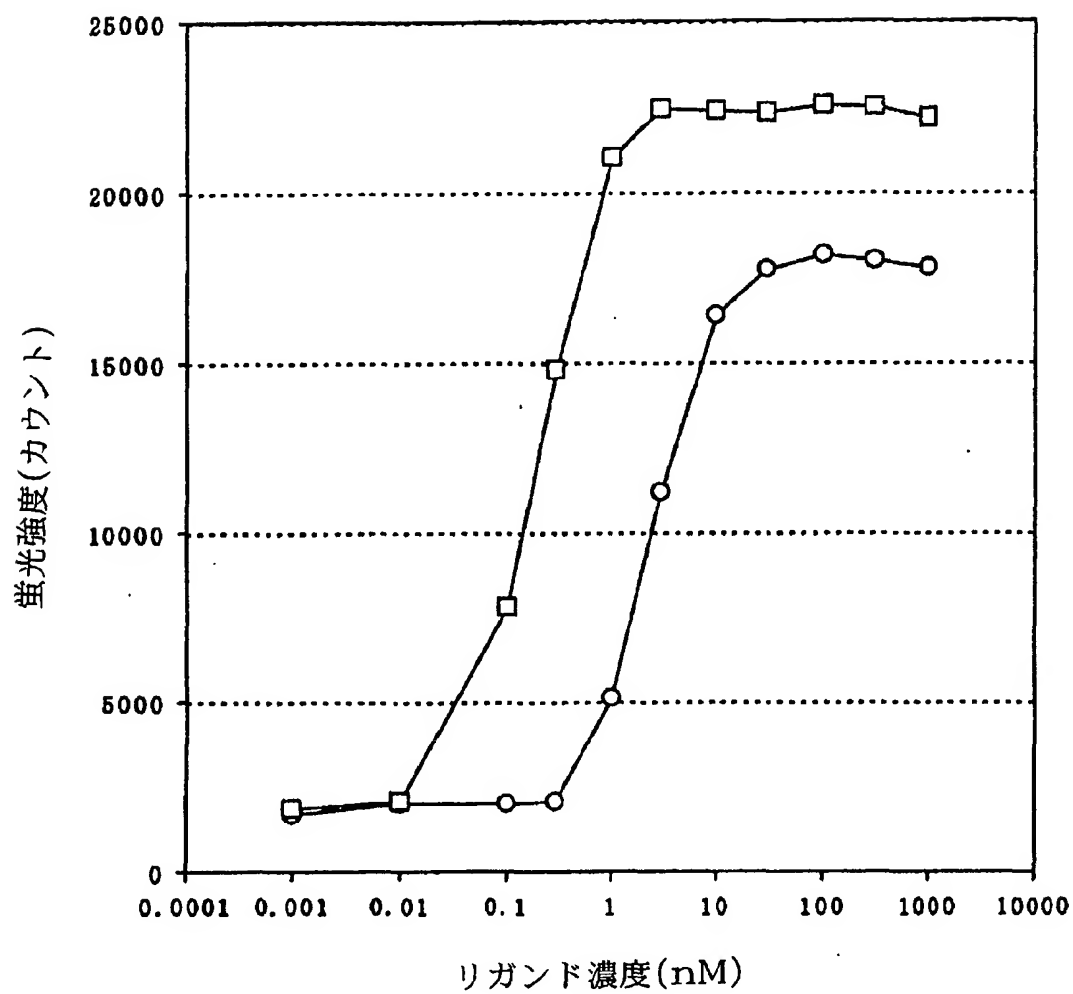
10/30

図10



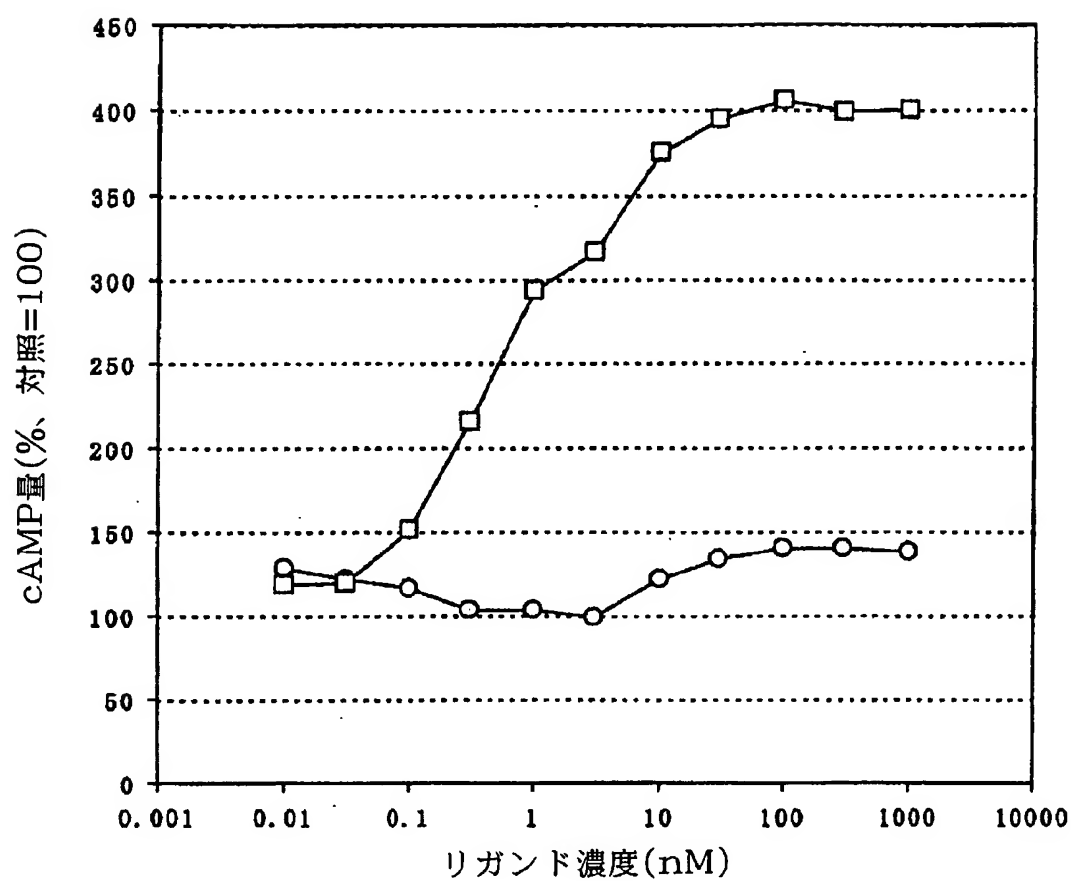
11/30

図11



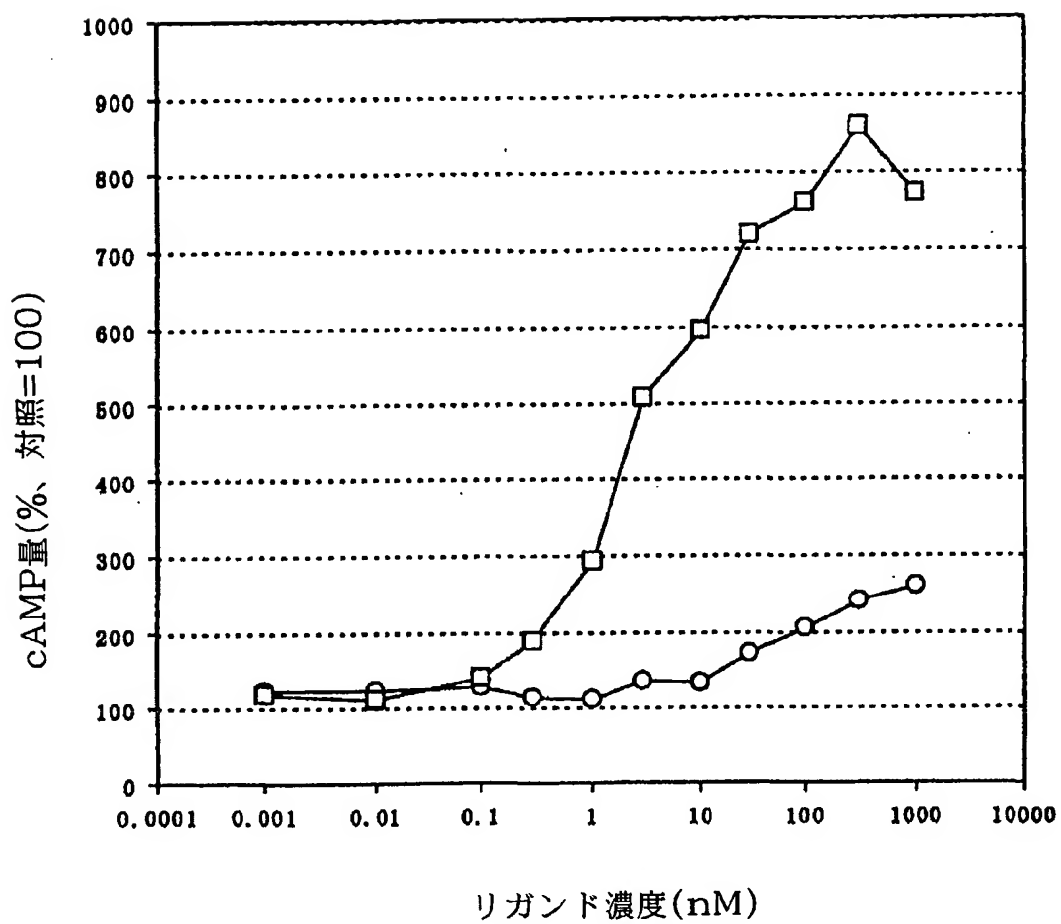
12/30

図12



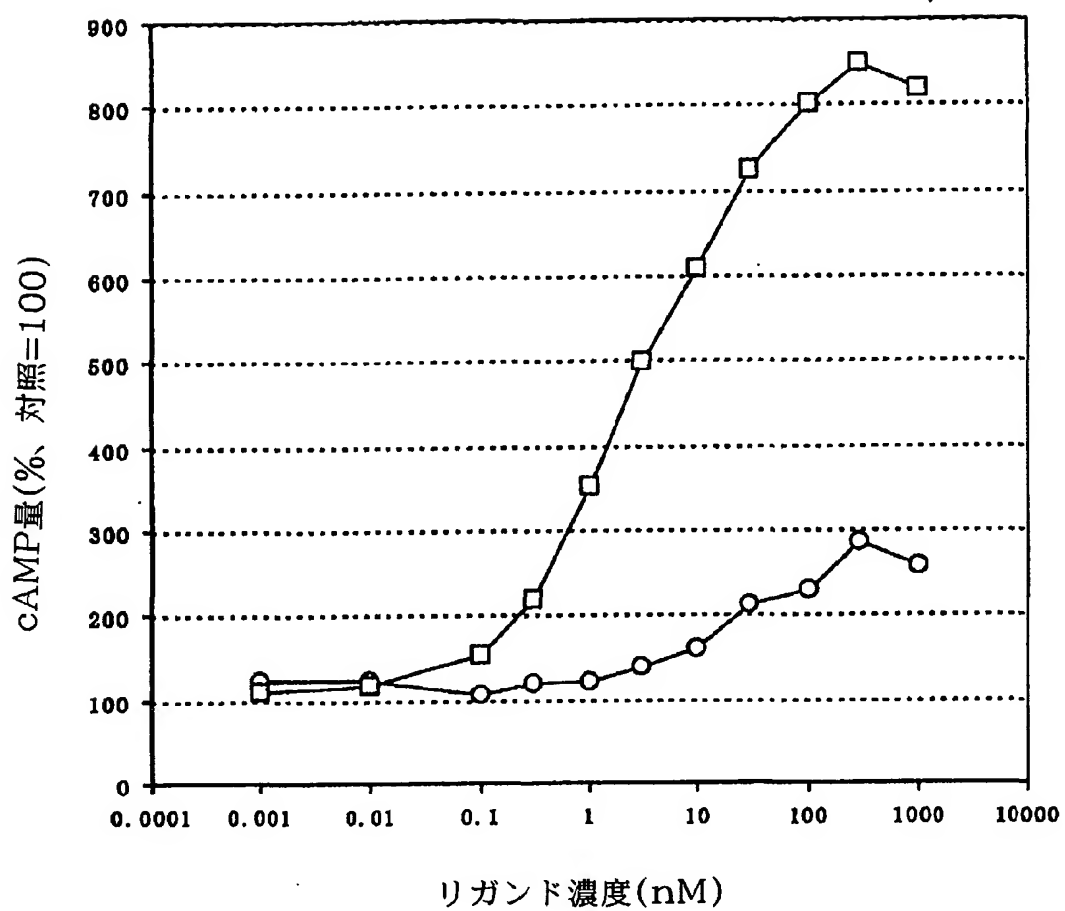
13/30

図13



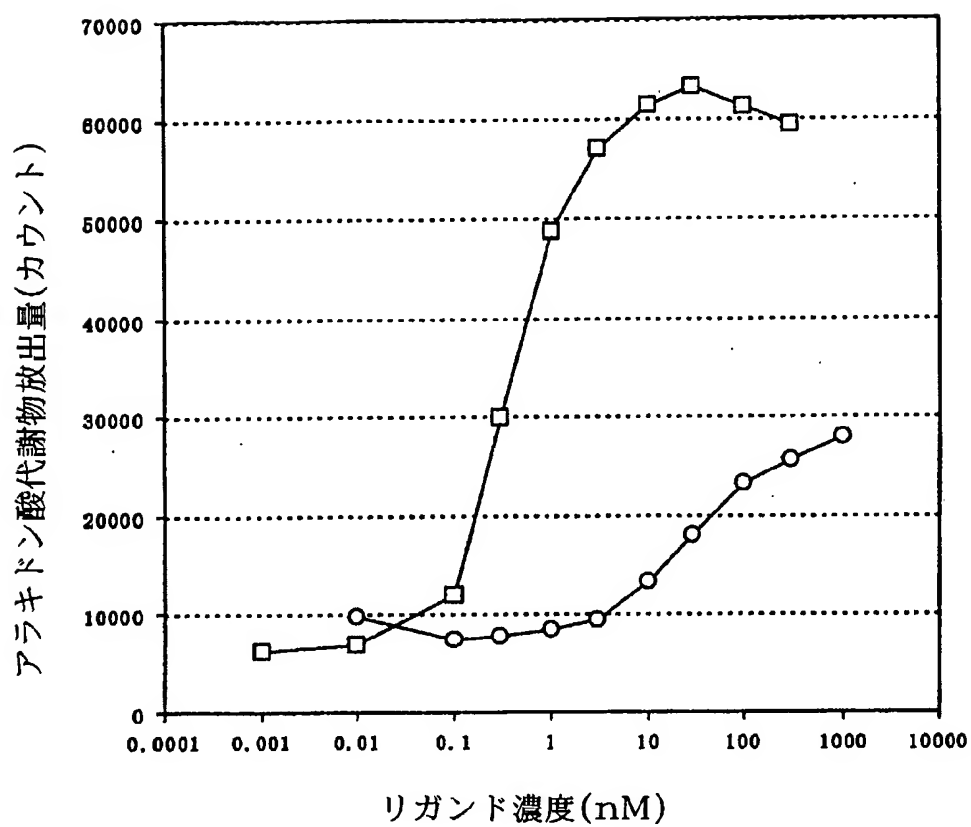
14/30

図14



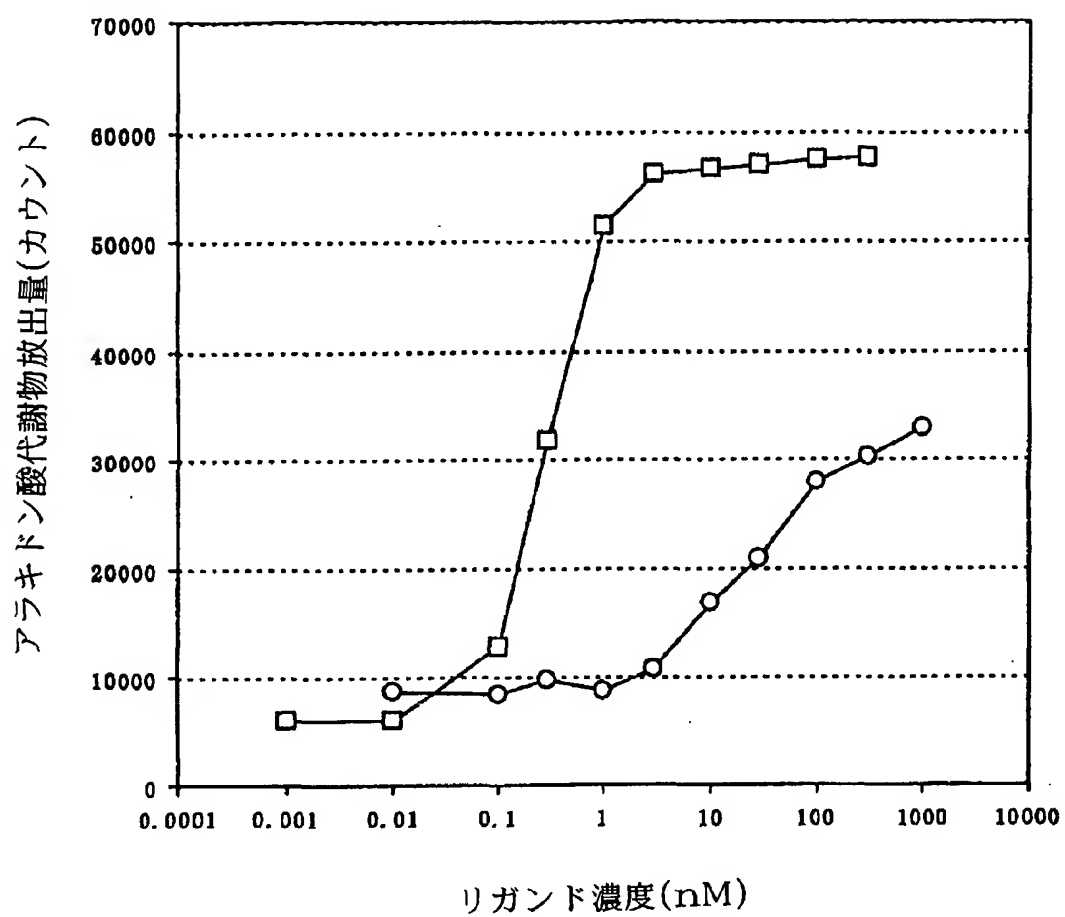
15/30

図15



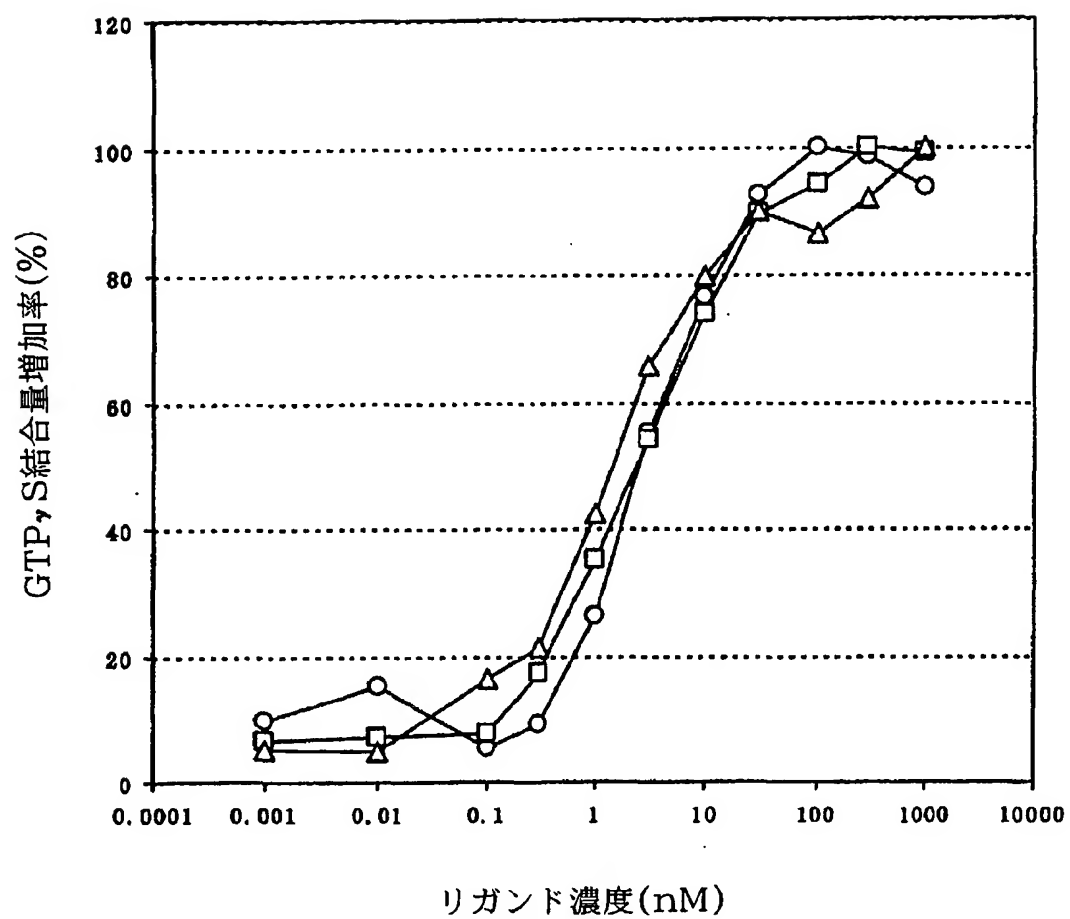
16/30

図16



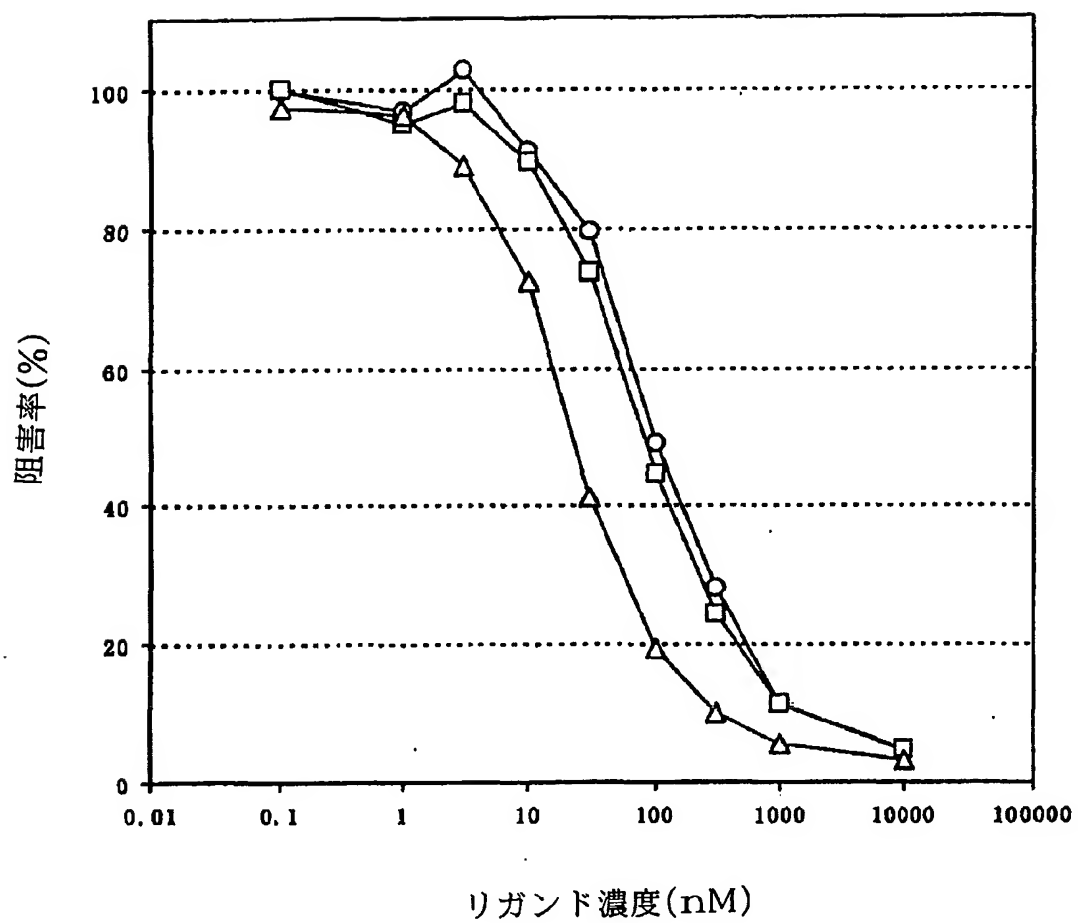
17/30

図17



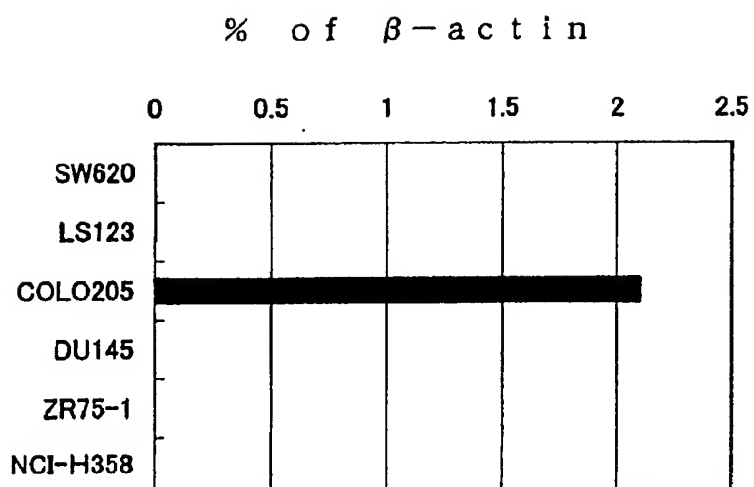
18/30

図18



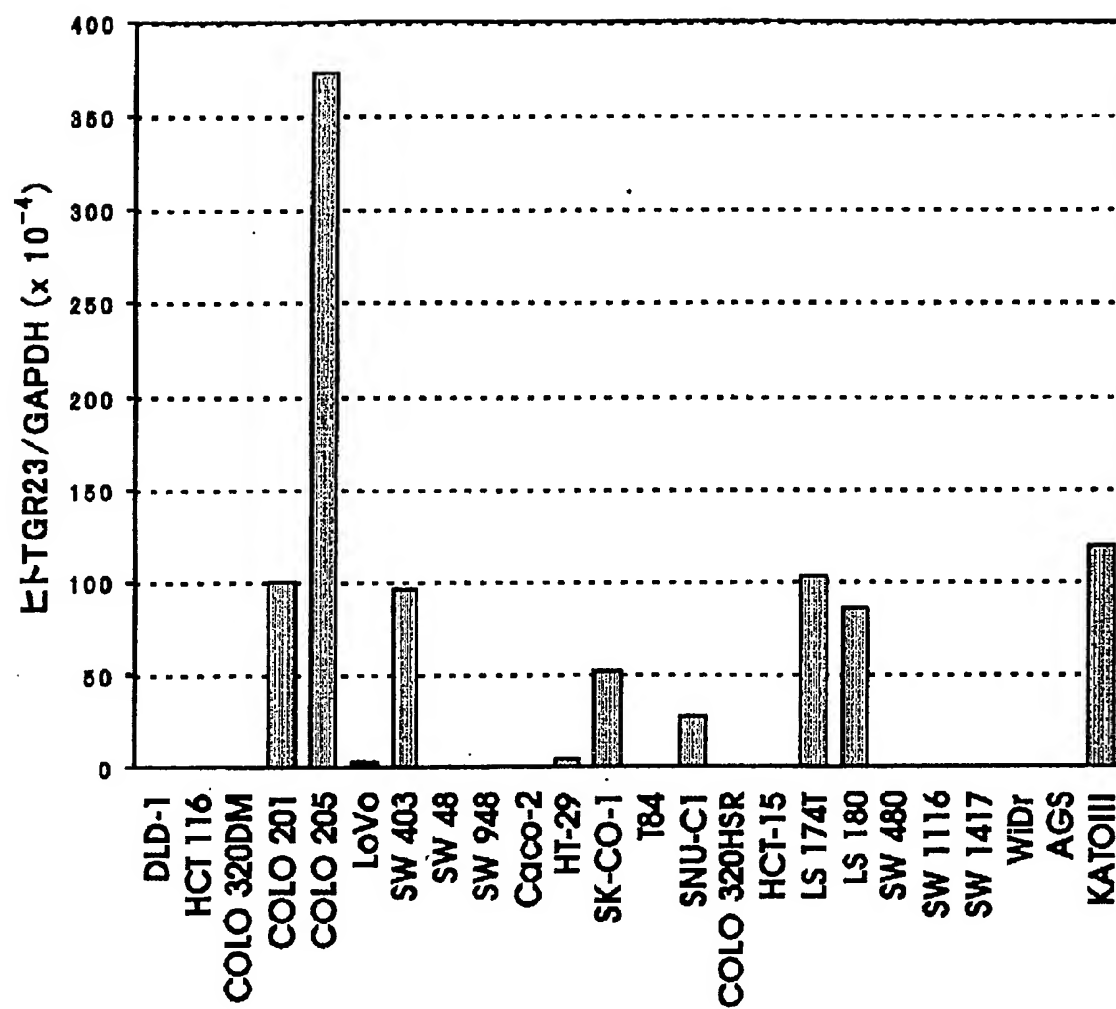
19/30

図19



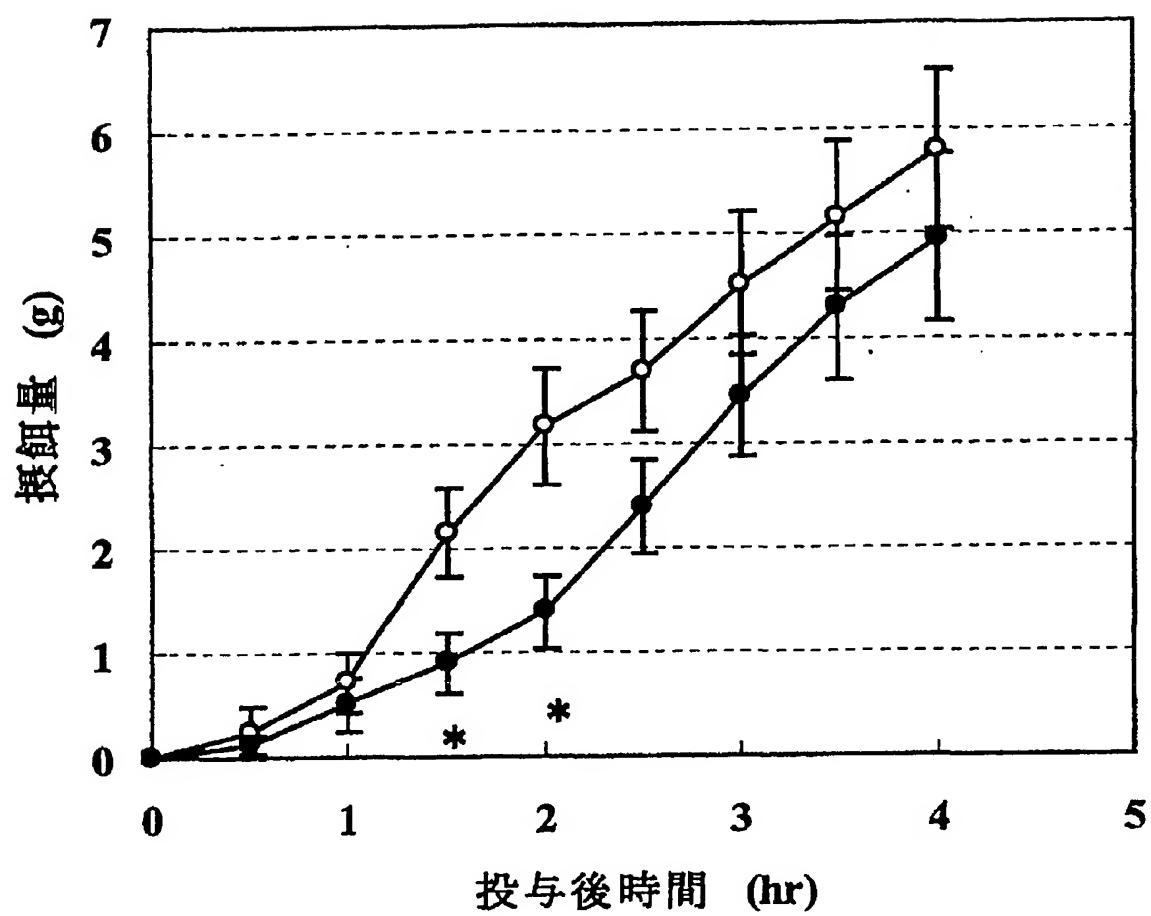
20/30

図20



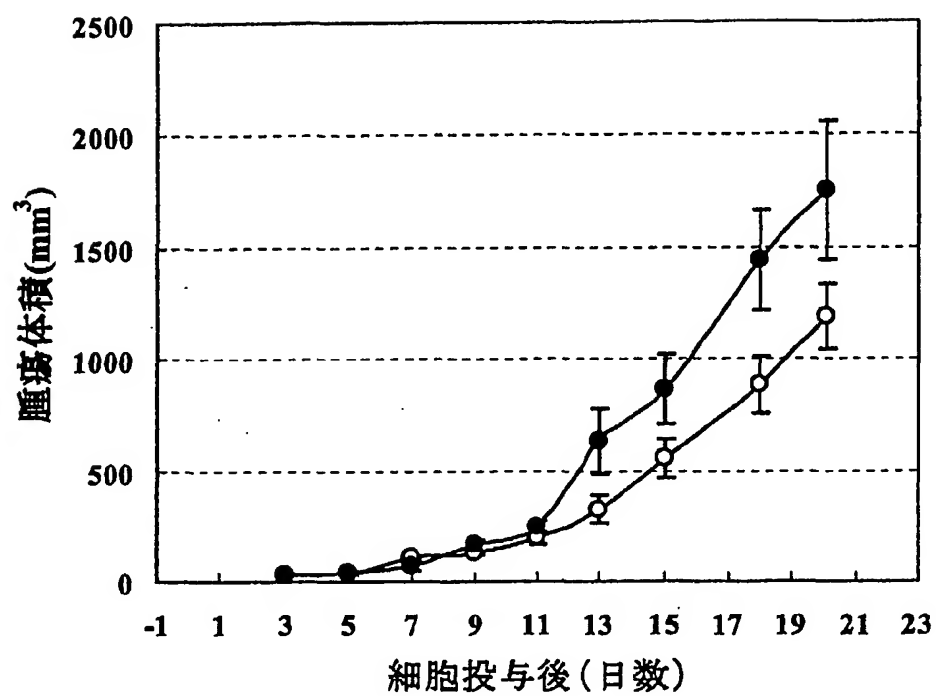
21/30

図21



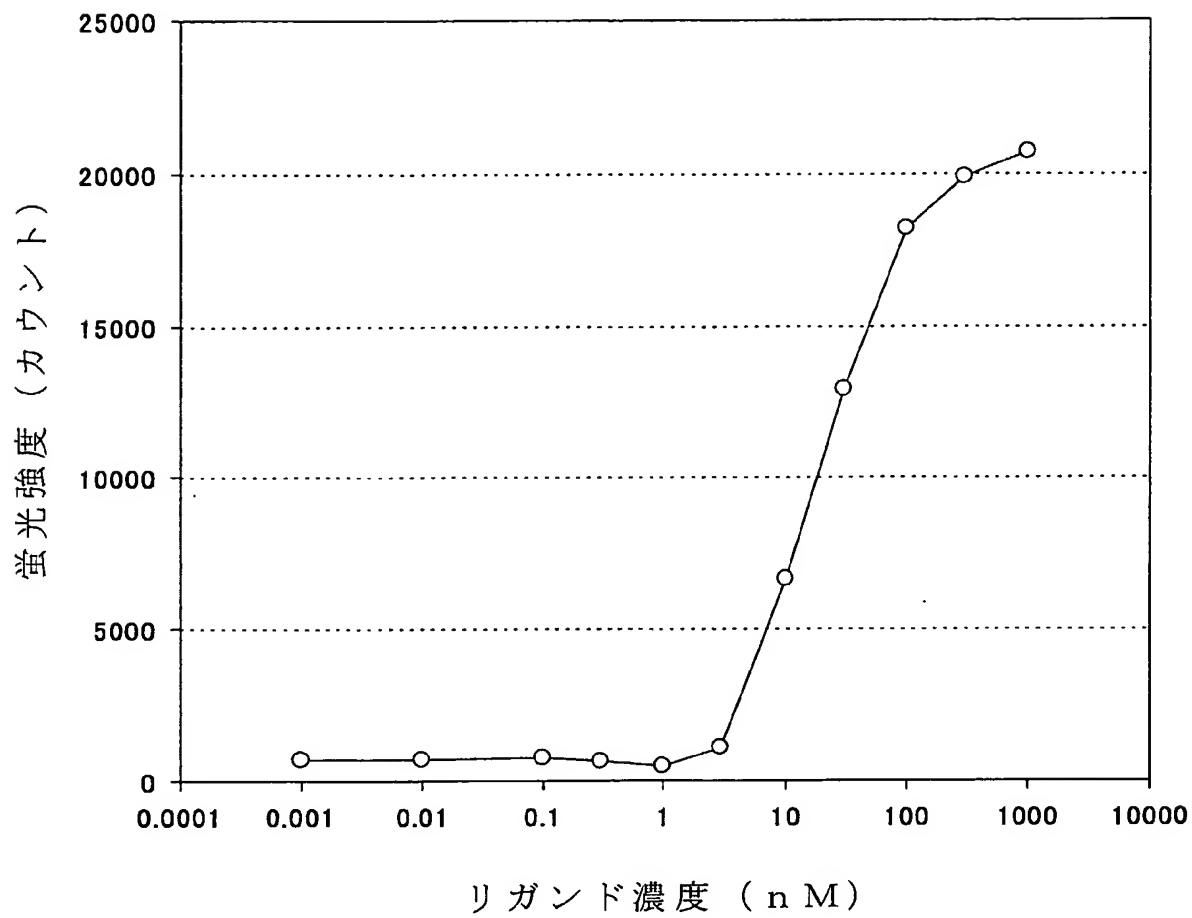
22/30

図22



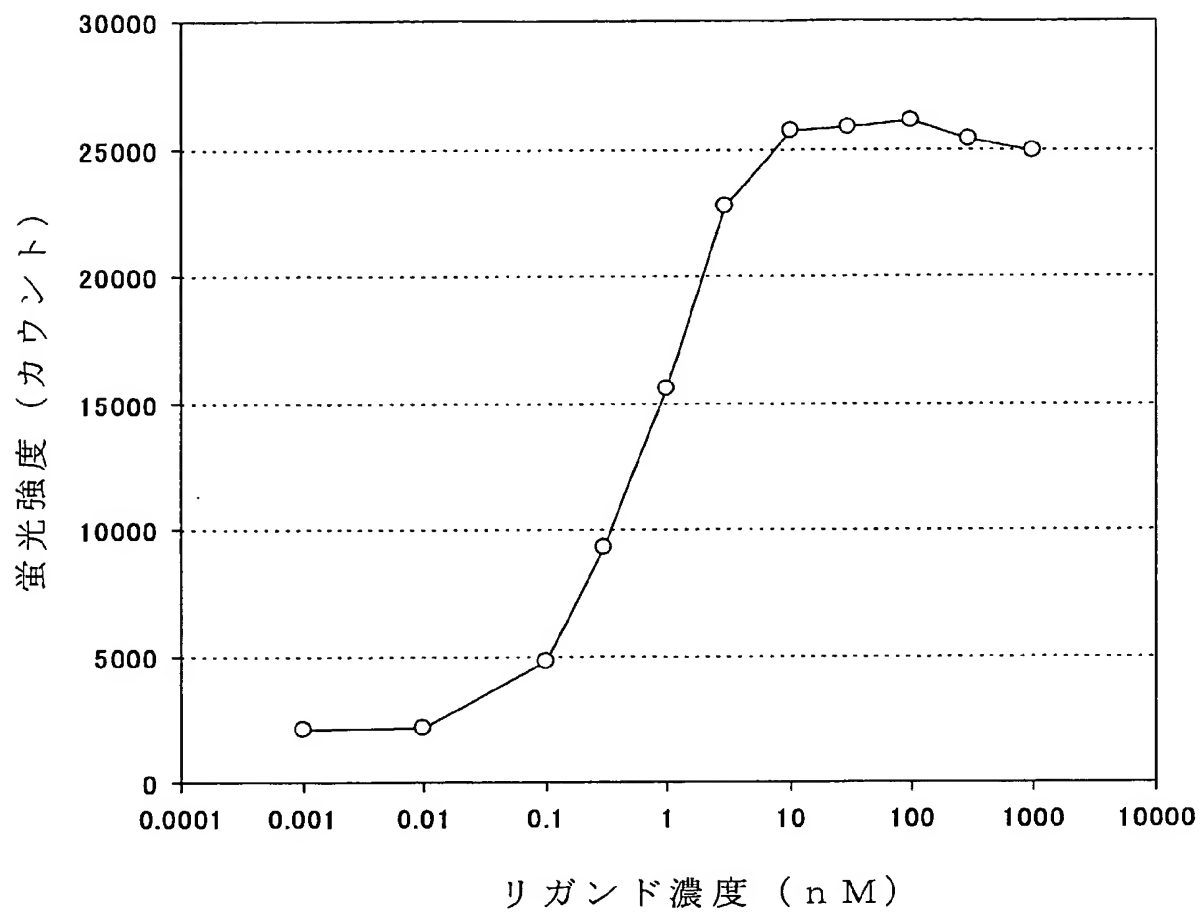
23/30

図 2 3



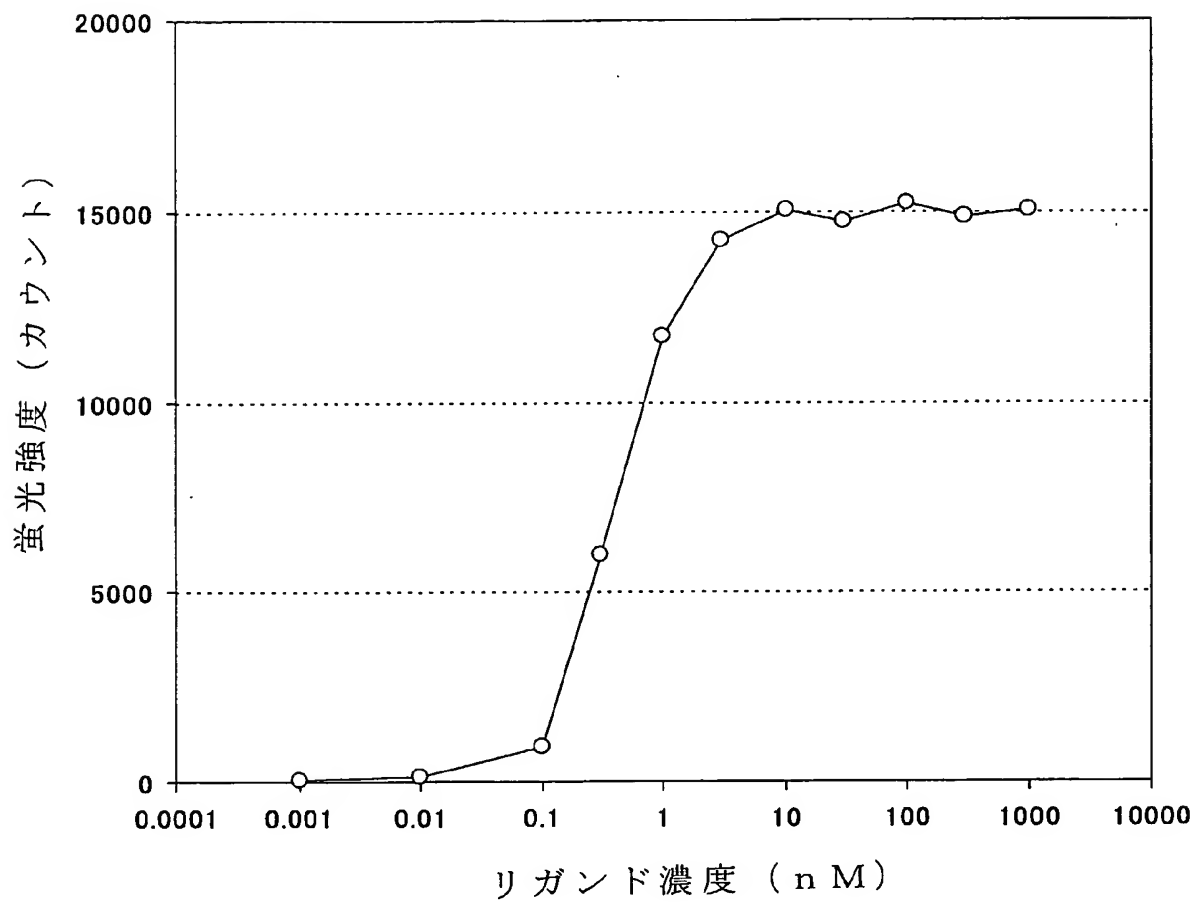
24/30

図 2 4



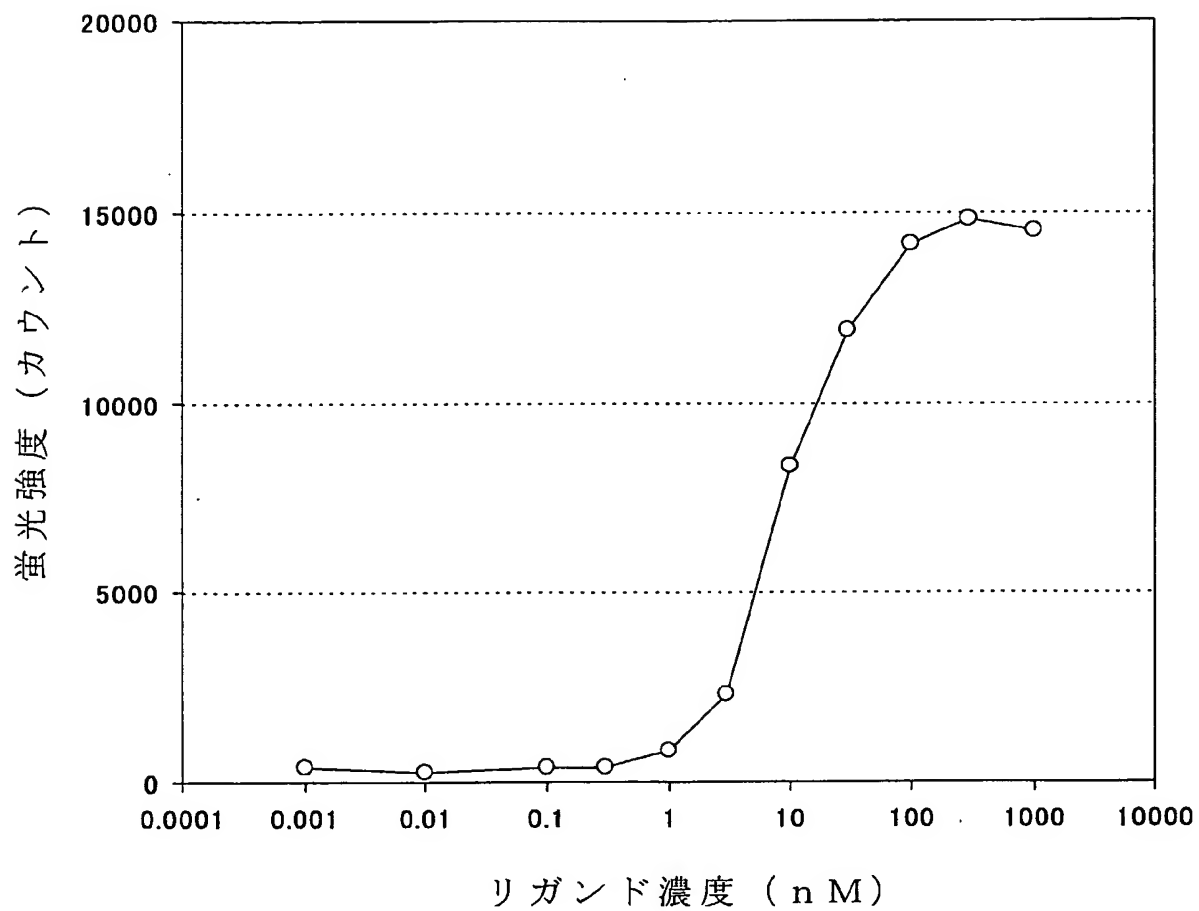
25/30

図 2 5



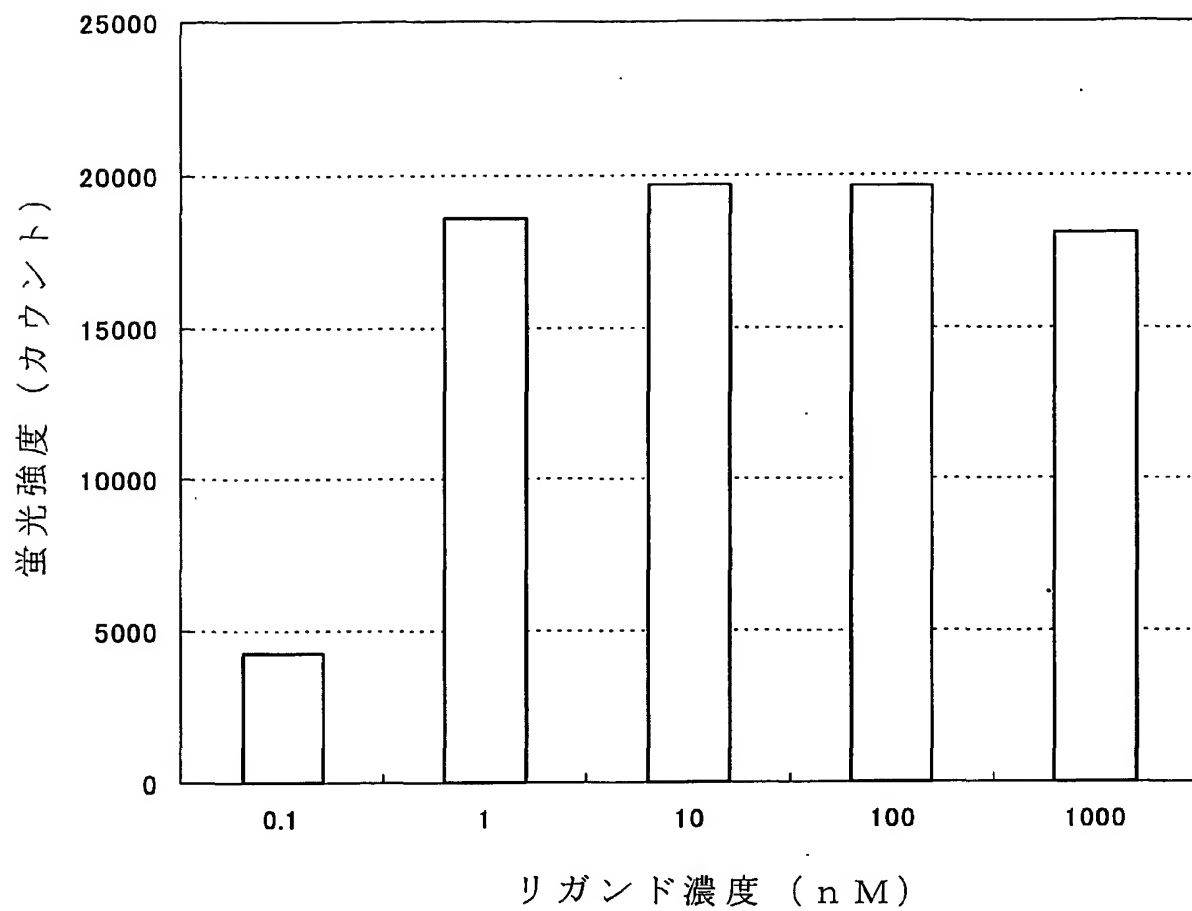
26/30

図 26



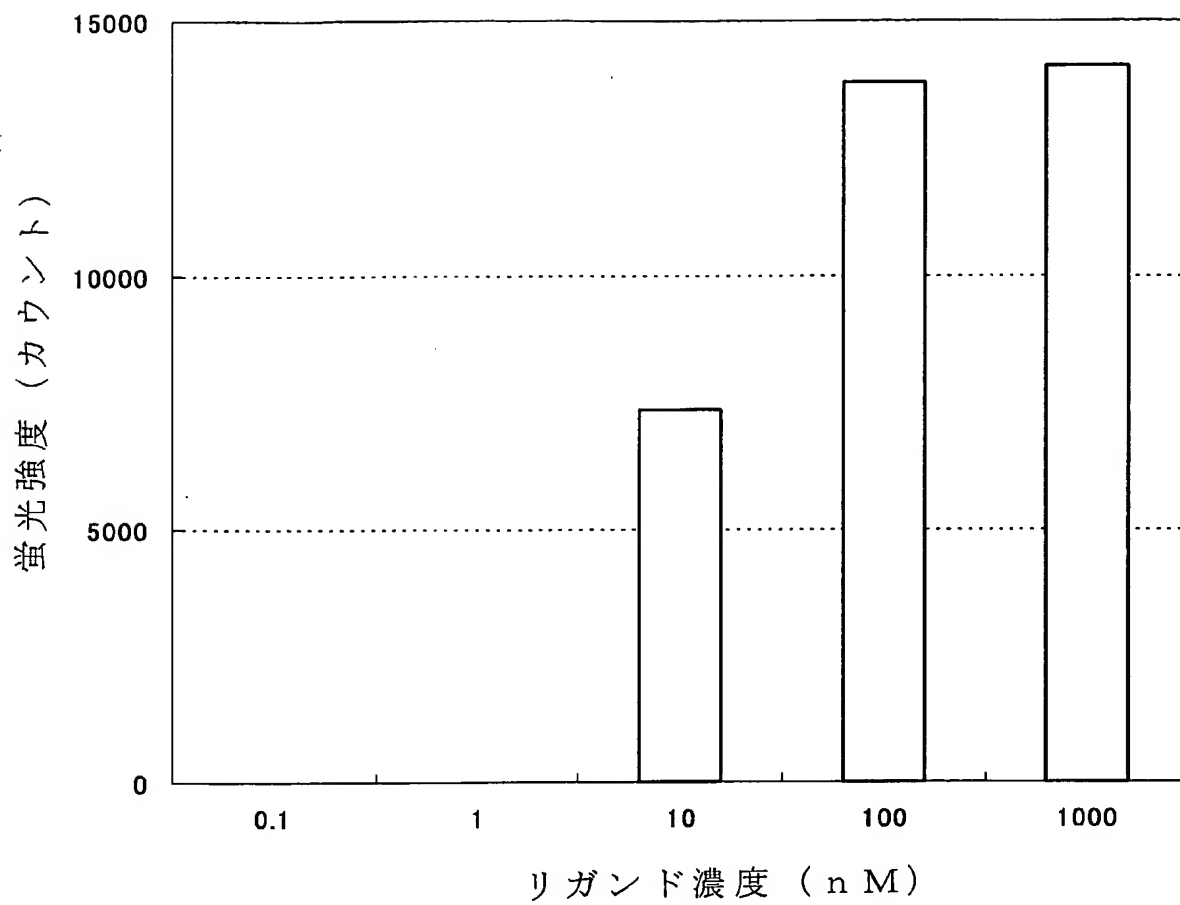
27/30

図 27



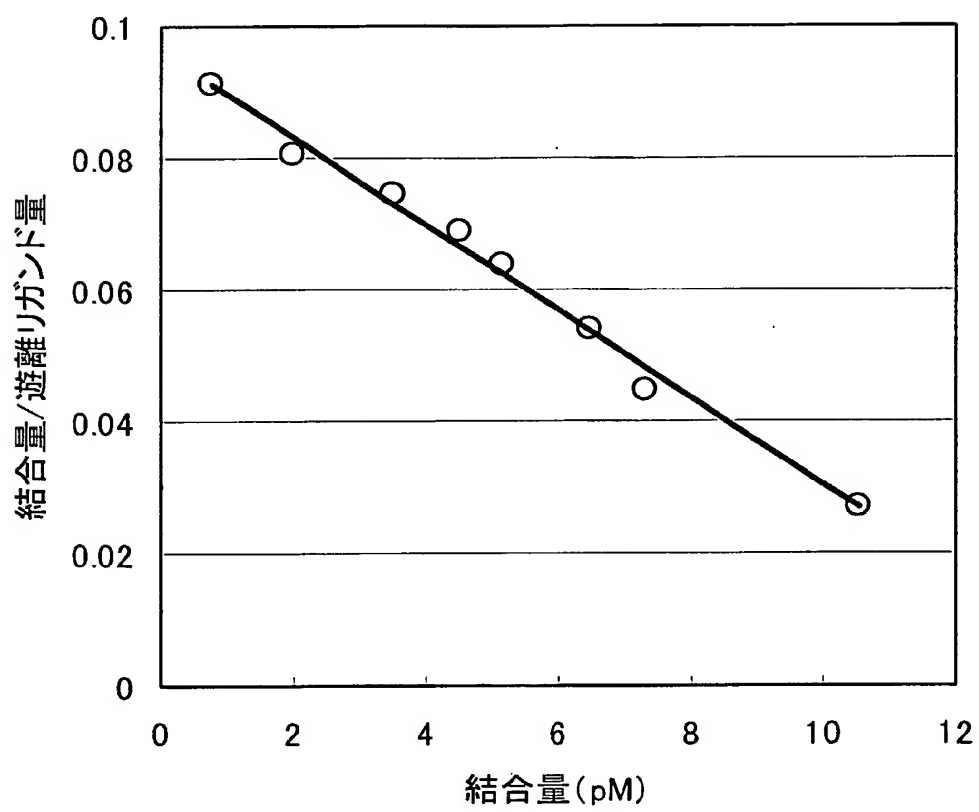
28/30

図 28



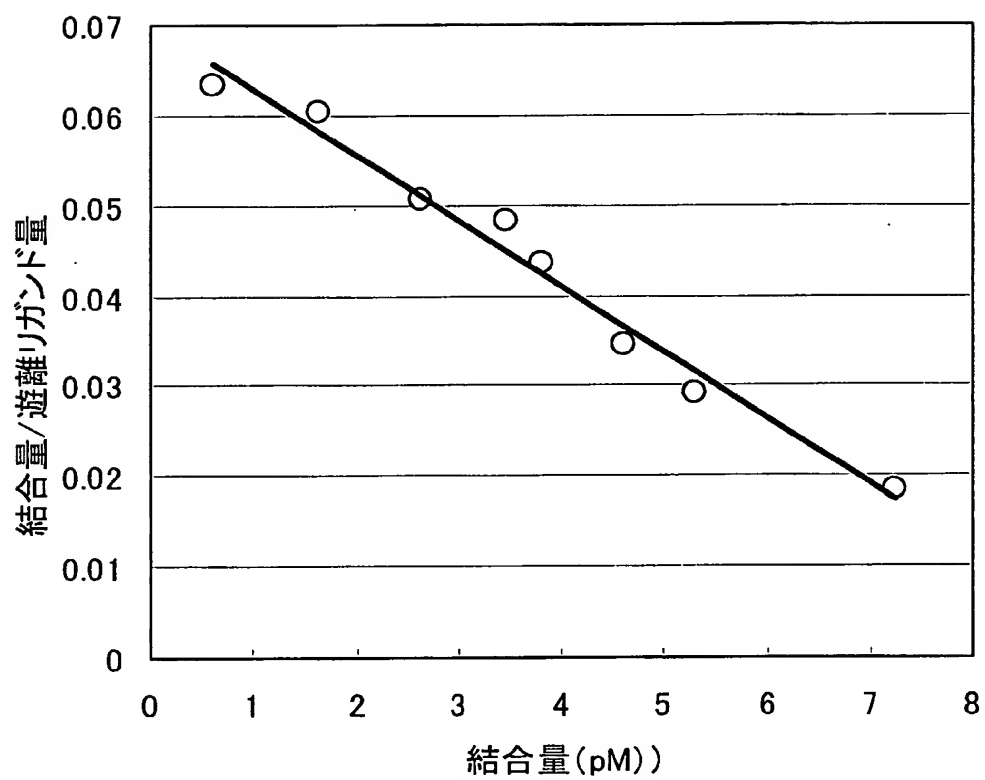
29/30

図 2 9



30/30

図 30



1/95

配列表

[Sequence Listing]

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel polypeptide, its DNA and use thereof

<130> P02-0100PCT

<150> JP 2001-279232

<151> 2001-09-14

<150> JP 2001-315148

<151> 2001-10-12

<150> JP 2002-108621

<151> 2002-04-10

<150> JP 2002-169232

<151> 2002-06-10

<160> 124

<210> 1

<211> 371

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

2/95

Met Pro Ala Asn Phe Thr Glu Gly Ser Phe Asp Ser Ser G
 5 10 15
 Gln Thr Leu Asp Ser Ser Pro Val Ala Cys Thr Glu Thr Val Thr Phe
 20 25 30
 Thr Glu Val Val Glu Gly Lys Glu Trp Gly Ser Phe Tyr Tyr Ser Phe
 35 40 45
 Lys Thr Glu Gln Leu Ile Thr Leu Trp Val Leu Phe Val Phe Thr Ile
 50 55 60
 Val Gly Asn Ser Val Val Leu Phe Ser Thr Trp Arg Arg Lys Lys Lys
 65 70 75 80
 Ser Arg Met Thr Phe Phe Val Thr Gln Leu Ala Ile Thr Asp Ser Phe
 85 90 95
 Thr Gly Leu Val Asn Ile Leu Thr Asp Ile Asn Trp Arg Phe Thr Gly
 100 105 110
 Asp Phe Thr Ala Pro Asp Leu Val Cys Arg Val Val Arg Tyr Leu Gln
 115 120 125
 Val Val Leu Leu Tyr Ala Ser Thr Tyr Val Leu Val Ser Leu Ser Ile
 130 135 140
 Asp Arg Tyr His Ala Ile Val Tyr Pro Met Lys Phe Leu Gln Gly Glu
 145 150 155 160
 Lys Gln Ala Arg Val Leu Ile Val Ile Ala Trp Ser Leu Ser Phe Leu
 165 170 175
 Phe Ser Ile Pro Thr Leu Ile Ile Phe Gly Lys Arg Thr Leu Ser Asn
 180 185 190
 Gly Glu Val Gln Cys Trp Ala Leu Trp Pro Asp Asp Ser Tyr Trp Thr
 195 200 205
 Pro Tyr Met Thr Ile Val Ala Phe Leu Val Tyr Phe Ile Pro Leu Thr
 210 215 220
 Ile Ile Ser Ile Met Tyr Gly Ile Val Ile Arg Thr Ile Trp Ile Lys

3/95

225 230 235
 Ser Lys Thr Tyr Glu Thr Val Ile Ser Asn Cys Ser Asp Gly Lys Leu
 245 250 255
 Cys Ser Ser Tyr Asn Arg Gly Leu Ile Ser Lys Ala Lys Ile Lys Ala
 260 265 270
 Ile Lys Tyr Ser Ile Ile Ile Ile Leu Ala Phe Ile Cys Cys Trp Ser
 275 280 285
 Pro Tyr Phe Leu Phe Asp Ile Leu Asp Asn Phe Asn Leu Leu Pro Asp
 290 295 300
 Thr Gln Glu Arg Phe Tyr Ala Ser Val Ile Ile Gln Asn Leu Pro Ala
 305 310 315 320
 Leu Asn Ser Ala Ile Asn Pro Leu Ile Tyr Cys Val Phe Ser Ser Ser
 325 330 335
 Ile Ser Phe Pro Cys Arg Glu Gln Arg Ser Gln Asp Ser Arg Met Thr
 340 345 350
 Phe Arg Glu Arg Thr Glu Arg His Glu Met Gln Ile Leu Ser Lys Pro
 355 360 365
 Glu Phe Ile
 370

<210> 2

<211> 1113

<212> DNA

<213> Human

<400> 2

atgccagcca acttcacaga gggcagcttc gattccagtg ggaccgggca gacgctggat 60
 tcttccccag tggcttgac tgaacagtg acttttactg aagtgggtga aggaaaggaa 120
 tggggttcct tctactactc cttaaagact gagcaattga taactctgtg ggtcctcttt 180

4/95

```

gtttttacca ttgttgga aa ctccgttg tg cttttttcca catggagg
tcaagaatga ctttctttgt gactcagctg gccatcacag attctttcac aggactggtc 300
aacatcttga cagatattaa ttggcgattc acitggagact tcacggcacc tgacctgggt 360
tgccgagtgg tccgctattt gcaggtttg tg ctgctctacg cctctaccta cgtcctgggtg 420
tccctcagca tagacagata ccatgccatc gtctacccca tgaagttcct tcaaggagaa 480
aagcaagcca gggtcctcat tgtgatcgcc tggagcctgt cttttctgtt ctccattccc 540
acctgatca tatttgggaa gaggacacig tccaacgggtg aagtgcagtg ctgggccctg 600
tggcctgaag actcctactg gaccccaaac atgaccatcg tggccttcct ggtgtacttc 660
atccctctga caatcatcag catcatgtat ggcatitgtg tccgaactat ttggattaaa 720
agcaaaacct acgaaacagt gatttccaac tgctcagatg ggaaactgtg cagcagctat 780
aaccgaggac tcattctcaa ggcaaaaatc aaggctatca agtatagcat catcatcatt 840
cttgccctca tctgtgttg gagtccatac ttccigtgtg acattttgga caatttcaac 900
ctccttccag acaccagga gcgtttctat gcctctgtga tcattcagaa cctgccagca 960
ttgaatagtg ccatcaacc cctcatctac tgtgtcttca gcagctccat ctctttcccc 1020
tgcagggagc aaagatcaca ggattccaga atgacgttcc gggagagaac tgagaggcat 1080
gagatgcaga ttctgtccaa gccagaattc atc 1113

```

<210> 3

<211> 371

<212> PRT

<213> Human

<400> 3

```

Met Pro Ala Asn Phe Thr Glu Gly Ser Phe Asp Ser Ser Gly Thr Gly
      5              10              15
Gln Thr Leu Asp Ser Ser Pro Val Ala Cys Thr Glu Thr Val Thr Phe
      20              25              30
Thr Glu Val Val Glu Gly Lys Glu Trp Gly Ser Phe Tyr Tyr Ser Phe
      35              40              45

```

5/95

Lys Thr Glu Gln Leu Ile Thr Leu Trp Val Leu Phe Val I
 50 55 60
 Val Gly Asn Ser Val Val Leu Phe Ser Thr Trp Arg Arg Lys Lys Lys
 65 70 75 80
 Ser Arg Met Thr Phe Phe Val Thr Gln Leu Ala Ile Thr Asp Ser Phe
 85 90 95
 Thr Gly Leu Val Asn Ile Leu Thr Asp Ile Ile Trp Arg Phe Thr Gly
 100 105 110
 Asp Phe Thr Ala Pro Asp Leu Val Cys Arg Val Val Arg Tyr Leu Gln
 115 120 125
 Val Val Leu Leu Tyr Ala Ser Thr Tyr Val Leu Val Ser Leu Ser Ile
 130 135 140
 Asp Arg Tyr His Ala Ile Val Tyr Pro Met Lys Phe Leu Gln Gly Glu
 145 150 155 160
 Lys Gln Ala Arg Val Leu Ile Val Ile Ala Trp Ser Leu Ser Phe Leu
 165 170 175
 Phe Ser Ile Pro Thr Leu Ile Ile Phe Gly Lys Arg Thr Leu Ser Asn
 180 185 190
 Gly Glu Val Gln Cys Trp Ala Leu Trp Pro Asp Asp Ser Tyr Trp Thr
 195 200 205
 Pro Tyr Met Thr Ile Val Ala Phe Leu Val Tyr Phe Ile Pro Leu Thr
 210 215 220
 Ile Ile Ser Ile Met Tyr Gly Ile Val Ile Arg Thr Ile Trp Ile Lys
 225 230 235 240
 Ser Lys Thr Tyr Glu Thr Val Ile Ser Asn Cys Ser Asp Gly Lys Leu
 245 250 255
 Cys Ser Ser Tyr Asn Arg Gly Leu Ile Ser Lys Ala Lys Ile Lys Ala
 260 265 270
 Ile Lys Tyr Ser Ile Ile Ile Ile Leu Ala Phe Ile Cys Cys Trp Ser

6/95

275	280	285
Pro Tyr Phe Leu Phe Asp Ile Leu Asp Asn Phe Asn Leu Leu Pro Asp		
290	295	300
Thr Gln Glu Arg Phe Tyr Ala Ser Val Ile Ile Gln Asn Leu Pro Ala		
305	310	315
Leu Asn Ser Ala Ile Asn Pro Leu Ile Tyr Cys Val Phe Ser Ser Ser		
325	330	335
Ile Ser Phe Pro Cys Arg Glu Arg Arg Ser Gln Asp Ser Arg Met Thr		
340	345	350
Phe Arg Glu Arg Thr Glu Arg His Glu Met Gln Ile Leu Ser Lys Pro		
355	360	365
Glu Phe Ile		
370		

<210> 4

<211> 1113

<212> DNA

<213> Human

<400> 4

atgccagcca acttcacaga gggcagcttc gattccagtg ggaccgggca gacgctggat	60
tcttccccag tggcttgcac tgaaacagtg acttttactg aagtgggtgga aggaaaggaa	120
tggggttcct tctactactc cttaagact gagcaattga taactctgtg ggtccctcitt	180
gttttlacca ttgttgaaa ctccgttgtg cttttttcca catggaggag aaagaagaag	240
tcaagaatga ccttctttgt gactcagctg gccatcacag attctttcac aggactggtc	300
aacatcttga cagatattat ttggcgattc actggagact tcacggcacc tgacctgggtt	360
tgccgagtgg tccgctatit gcaggttgtg ctgctctacg cctctaccta cgtcctgggtg	420
tccctcagca tagacagata ccatgccatc gtctacccca tgaagttcct tcaaggagaa	480
aagcaagcca gggctctcat tgtgatcgcc tggagcctgt cttttctgtt ctccattccc	540

7/95

```

accctgatca tatttgggaa gaggacactg tccaacggig aagtgcagi
tggcctgacg actcctactg gacccatac atgaccatcg tggcctttct ggtgtacttc 660
atccctctga caatcatcag catcatgiat ggcatgtga tccgaactat ttggattaaa 720
agcaaaacct acgaaacagt gatticcaac tgctcagatg ggaaactgtg cagcagctat 780
aaccgaggac tcatttcaaa ggcaaaaatc aaggctatca agtatagcat catcatcatt 840
cttgccitca tctgctgttg gattccatac ttctgtttg acattttgga caatttcaac 900
ctccttccag acaccagga gcgtttctat gccctgtga tcattcagaa cctgccagca 960
ttgaatagtg ccatcaacc cctcatctac tgtgtcttca gcagctccat ctctttcccc 1020
tgcagggagc gaagatcaca ggattccaga atgacgttcc gggagagAAC cgagaggcat 1080
gagatgcaga ttctgtccaa gccagaattc atc 1113

```

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding TGR23-1 or
TGR23-2

<400> 5

```

atgccagcca acttcacaga gg 22

```

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

8/95

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA
TGR23-2

<400> 6

ctagatgaat tctggcttgg acag 24

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 7

tatagtcgac atgccagcca acttcac 27

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 8

tgtcactagt ctagatgaat tctggctt 28

<210> 9

9/95

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 9

ttcactggag acitcacggc a 21

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 10

tagaggcgta gagcagcaca ac 22

<210> 11

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

10/95

<400> 11

accctgggttg ccgagtggtc cgctattt 28

<210> 12

<211> 18

<212> PRT

<213> Rat

<400> 12

Ser	Phe	Arg	Asn	Gly	Val	Gly	Ser	Gly	Val	Lys	Lys	Thr	Ser	Phe	Arg
				5				10				15			

Arg Ala

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> Rat

<400> 13

Ser	Phe	Arg	Asn	Gly	Val	Gly	Ser	Gly	Val	Lys	Lys	Thr	Ser	Phe
				5				10				15		

<210> 14

<211> 14

<212> PRT

<213> Rat

<400> 14

Ser Phe Arg Asn Gly Val Gly Ser Gly Val Lys Lys Thr Ser

11/95

5

10

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 15

cagattttgg gaagtcctaaa atga 24

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 16

gagtacgtca gtcacactct acag 24

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

12/95

<220>

<223> Primer

<400> 17

agattaattc cccgagtcct ttgc 24

<210> 18

<211> 322

<212> DNA

<213> Human

<400> 18

cagat	tttgg	gaagtc	caaa	atgatt	tagct	cagtaaa	act	caatct	catc	ctagt	tctgt	60
cgctg	tccac	aatgca	tgtg	ttttgg	tgtt	atccagt	tcc	atctt	ctaag	gtgtc	tggaa	120
aatct	gatta	ctttct	catt	ctgct	gaaca	gctgccc	aac	cagatt	ggac	aggag	caaag	180
aacta	gcitt	tctaa	agcca	attttg	gaga	agatg	tttgt	gaaaag	gtcc	tttcg	caatg	240
gagtt	ggcac	agggat	gaaa	aaaact	tcct	ttcaa	agagc	aaaat	catga	ctaag	tgtgc	300
aaagg	actcg	gggaat	taat	ct								322

<210> 19

<211> 89

<212> PRT

<213> Human

<400> 19

Met	Ile	Ser	Ser	Val	Lys	Leu	Asn	Leu	Ile	Leu	Val	Leu	Ser	Leu	Ser
				5				10				15			
Thr	Met	His	Val	Phe	Trp	Cys	Tyr	Pro	Val	Pro	Ser	Ser	Lys	Val	Ser
				20				25				30			

13/95

Gly Lys Ser Asp Tyr Phe Leu Ile Leu Leu Asn Ser Cys I
35 40 45
Leu Asp Arg Ser Lys Glu Leu Ala Phe Leu Lys Pro Ile Leu Glu Lys
50 55 60
Met Phe Val Lys Arg Ser Phe Arg Asn Gly Val Gly Thr Gly Met Lys
65 70 75 80
Lys Thr Ser Phe Gln Arg Ala Lys Ser
85

<210> 20

<211> 18

<212> PRT

<213> Human

<400> 20

Ser Phe Arg Asn Gly Val Gly Thr Gly Met Lys Lys Thr Ser Phe Gln
5 10 15
Arg Ala

<210> 21

<211> 15

<212> PRT

<213> Human

<400> 21

Ser Phe Arg Asn Gly Val Gly Thr Gly Met Lys Lys Thr Ser Phe
5 10 15

<210> 22

14/95

<211> 14

<212> PRT

<213> Human

<400> 22

Ser Phe Arg Asn Gly Val Gly Thr Gly Met Lys Lys Thr Ser

5

10

<210> 23

<211> 20

<212> PRT

<213> Human

<400> 23

Ser Phe Arg Asn Gly Val Gly Thr Gly Met Lys Lys Thr Ser Phe Gln

5

10

15

Arg Ala Lys Ser

20

<210> 24

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 24

ccagtcacac aggagggatc tcaa 24

15/95

<210> 25

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 25

gcacatcagt cacactctac atag 24

<210> 26

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 26

agattaattc ccagagtcct ttgc 24

<210> 27

<211> 443

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 27

16/95

```

ccagtcacac aggaggatc tcaatgacat ttttacttct gaacttttc
ggccacccaa gcaggctcag acagcaaacg tgaggaaatt ggcaataaaa acccatctgc 120
gcaggctctcg gaaaatccaa aatgattggc tcgttaaaac tcagcttcgt cttagctctg 180
tcgctgtctg taatgcacgt gctttgggtg tatccgggcc tctcttccaa ggtgcctggg 240
aagcctgatt actttctcat ctgctgagc agctgcccag ccaggctgga ggggagcgac 300
aggctagctt ttctaaagcc aattttggag aagacatcga tgaaaaggic ctttcgcaac 360
ggagtcggct caggggcgaa aaaaacttcg ttctgaagag caaagcaatg aataagtggt 420
caaaggactc tgggaattaa tct 443

```

<210> 28

<211> 89

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 28

```

Met Ile Gly Ser Leu Lys Leu Ser Phe Val Leu Ala Leu Ser Leu Ser
      5              10              15
Val Met His Val Leu Trp Cys Tyr Pro Val Leu Ser Ser Lys Val Pro
      20              25              30
Gly Lys Pro Asp Tyr Phe Leu Ile Leu Leu Ser Ser Cys Pro Ala Arg
      35              40              45
Leu Glu Gly Ser Asp Arg Leu Ala Phe Leu Lys Pro Ile Leu Glu Lys
      50              55              60
Thr Ser Met Lys Arg Ser Phe Arg Asn Gly Val Gly Ser Gly Ala Lys
      65              70              75              80
Lys Thr Ser Phe Arg Arg Ala Lys Gln
      85

```

<210> 29

17/95

<211> 18

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 29

Ser Phe Arg Asn Gly Val Gly Ser Gly Ala Lys Lys Thr Ser Phe Arg

5

10

15

Arg Ala

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 30

Ser Phe Arg Asn Gly Val Gly Ser Gly Ala Lys Lys Thr Ser Phe

5

10

15

<210> 31

<211> 14

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 31

Ser Phe Arg Asn Gly Val Gly Ser Gly Ala Lys Lys Thr Ser

5

10

<210> 32

<211> 20

18/95

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 32

Ser Phe Arg Asn Gly Val Gly Ser Gly Ala Lys Lys Thr Ser Phe Arg

5

10

15

Arg Ala Lys Gln

20

<210> 33

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 33

ctgattactt tctcatyytg ctga 24

<210> 34

<211> 199

<212> DNA

<213> Rat

<400> 34

ctgattactt tctcattttg ctgagttacct gccagccag gctggagggg agcgacgggc 60

tagcttttct aaagccaatt ttggagaaga cgtcgatgaa aaggtccttt cgcaacggag 120

tcggctcagg ggtgaaaaaa acttcatttc gaagagcaaa gcaatgaata agtgtgcaaa 180

19/95

ggactctggg aattaatct

<210> 35

<211> 54

<212> PRT

<213> Rat

<400> 35

Asp Tyr Phe Leu Ile Leu Leu Ser Thr Cys Pro Ala Arg Leu Glu Gly

5

10

15

Ser Asp Gly Leu Ala Phe Leu Lys Pro Ile Leu Glu Lys Thr Ser Met

20

25

30

Lys Arg Ser Phe Arg Asn Gly Val Gly Ser Gly Val Lys Lys Thr Ser

35

40

45

Phe Arg Arg Ala Lys Gln

50

<210> 36

<211> 20

<212> PRT

<213> Rat

<400> 36

Ser Phe Arg Asn Gly Val Gly Ser Gly Val Lys Lys Thr Ser Phe Arg

5

10

15

Arg Ala Lys Gln

20

<210> 37

20/95

<211> 54

<212> DNA

<213> Rat

<400> 37

tcctttcgca acggagtcgg ctcaggggtg aaaaaaactt catttcgaag agca 54

<210> 38

<211> 45

<212> DNA

<213> Rat

<400> 38

tcctttcgca acggagtcgg ctcaggggtg aaaaaaactt cattt 45

<210> 39

<211> 42

<212> DNA

<213> Rat

<400> 39

tcctttcgca acggagtcgg ctcaggggtg aaaaaaactt ca 42

<210> 40

<211> 60

<212> DNA

<213> Rat

<400> 40

21/95

tcctttcgca acggagtcgg ctcaggggtg aaaaaaactt catttcga

<210> 41

<211> 54

<212> DNA

<213> Human

<400> 41

tcctttcgca atggagttag cacagggatg aaaaaaactt ctttcaaag agca 54

<210> 42

<211> 45

<212> DNA

<213> Human

<400> 42

tcctttcgca atggagttag cacagggatg aaaaaaactt cttt 45

<210> 43

<211> 42

<212> DNA

<213> Human

<400> 43

tcctttcgca atggagttag cacagggatg aaaaaaactt cc 42

<210> 44

<211> 60

<212> DNA

22/95

<213> Human

<400> 44

tccttttcgca atggagttgg cacagggatg aaaaaaacctt cctttcaaag agcaaaatca 60

<210> 45

<211> 54

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 45

tccttttcgca acggagtcgg ctcaggggcg aaaaaaacctt cgtttcgaag agca 54

<210> 46

<211> 45

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 46

tccttttcgca acggagtcgg ctcaggggcg aaaaaaacctt cgttt 45

<210> 47

<211> 42

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 47

tccttttcgca acggagtcgg ctcaggggcg aaaaaaacctt cg 42

23/95

<210> 48

<211> 60

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 48

tcctttcgca acggagtcgg ctcaggggcg aaaaaaactt cgtttcgaag agcaaagcaa 60

<210> 49

<211> 16

<212> PRT

<213> Human

<400> 49

Ser Phe Arg Asn Gly Val Gly Thr Gly Met Lys Lys Thr Ser Phe Gln

5

10

15

<210> 50

<211> 48

<212> DNA

<213> Human

<400> 50

tcctttcgca atggagttgg cacagggatg aaaaaaactt cctttcaa 48

<210> 51

<211> 371

<212> PRT

<213> Human

24/95

<220>

<221> VARIANT

<222> 273

<223> Xaa is Val or Ile.

<220>

<221> VARIANT

<222> 308

<223> Xaa is Arg or His.

<400> 51

Met Pro Ala Asn Phe Thr Glu Gly Ser Phe Asp Ser Ser Gly Thr Gly

5

10

15

Gln Thr Leu Asp Ser Ser Pro Val Ala Cys Thr Glu Thr Val Thr Phe

20

25

30

Thr Glu Val Val Glu Gly Lys Glu Trp Gly Ser Phe Tyr Tyr Ser Phe

35

40

45

Lys Thr Glu Gln Leu Ile Thr Leu Trp Val Leu Phe Val Phe Thr Ile

50

55

60

Val Gly Asn Ser Val Val Leu Phe Ser Thr Trp Arg Arg Lys Lys Lys

65

70

75

80

Ser Arg Met Thr Phe Phe Val Thr Gln Leu Ala Ile Thr Asp Ser Phe

85

90

95

Thr Gly Leu Val Asn Ile Leu Thr Asp Ile Asn Trp Arg Phe Thr Gly

100

105

110

Asp Phe Thr Ala Pro Asp Leu Val Cys Arg Val Val Arg Tyr Leu Gln

115

120

125

Val Val Leu Leu Tyr Ala Ser Thr Tyr Val Leu Val Ser Leu Ser Ile

25/95

130	135	140	
Asp Arg Tyr His Ala Ile Val Tyr Pro Met Lys Phe Leu Gln Gly Glu			
145	150	155	160
Lys Gln Ala Arg Val Leu Ile Val Ile Ala Trp Ser Leu Ser Phe Leu			
	165	170	175
Phe Ser Ile Pro Thr Leu Ile Ile Phe Gly Lys Arg Thr Leu Ser Asn			
	180	185	190
Gly Glu Val Gln Cys Trp Ala Leu Trp Pro Asp Asp Ser Tyr Trp Thr			
	195	200	205
Pro Tyr Met Thr Ile Val Ala Phe Leu Val Tyr Phe Ile Pro Leu Thr			
210	215	220	
Ile Ile Ser Ile Met Tyr Gly Ile Val Ile Arg Thr Ile Trp Ile Lys			
225	230	235	240
Ser Lys Thr Tyr Glu Thr Val Ile Ser Asn Cys Ser Asp Gly Lys Leu			
	245	250	255
Cys Ser Ser Tyr Asn Arg Gly Leu Ile Ser Lys Ala Lys Ile Lys Ala			
	260	265	270
Xaa Lys Tyr Ser Ile Ile Ile Ile Leu Ala Phe Ile Cys Cys Trp Ser			
	275	280	285
Pro Tyr Phe Leu Phe Asp Ile Leu Asp Asn Phe Asn Leu Leu Pro Asp			
290	295	300	
Thr Gln Glu Xaa Phe Tyr Ala Ser Val Ile Ile Gln Asn Leu Pro Ala			
305	310	315	320
Leu Asn Ser Ala Ile Asn Pro Leu Ile Tyr Cys Val Phe Ser Ser Ser			
	325	330	335
Ile Ser Phe Pro Cys Arg Glu Arg Arg Ser Gln Asp Ser Arg Met Thr			
	340	345	350
Phe Arg Glu Arg Thr Glu Arg His Glu Met Gln Ile Leu Ser Lys Pro			
355	360	365	

26/95

Glu Phe Ile

370

<210> 52

<211> 1113

<212> DNA

<213> Human

<400> 52

```

atgccagcca acttcacaga gggcagcttc gattccagtg ggaccgggca gacgctggat    60
tcttccccag tggcttgcac tgaacacagt acitttactg aagtgggtgga aggaaaggaa    120
tggggttcct tctactactc cttaagact gagcaattga taactctgtg ggtcctcttt    180
gtttttacca ttgttggaac ctccgttgtg cttttttcca catggaggag aaagaagaag    240
tcaagaatga ctttctttgt gactcagctg gccatcacag attctttcac aggactggtc    300
aacatcttga cagatattaa ttggcgattc actggagact tcacggcacc tgacctgggt    360
tgccgagtg tccgctatit gcaggttgtg ctgctctacg cctctacct cgtccctggg    420
tccctcagca tagacagata ccatgccatc gtctacccca tgaagttcct tcaaggagaa    480
aagcaagcca gggtcctcat tgtgatcgcc tggagcctgt cttttctgtt ctccattccc    540
acctgatca tatttgggaa gaggacactg tccaacgggt aagtgcagtg ctgggccctg    600
tggcctgaag actcctactg gacccatac atgaccatcg tggccttctt ggtgtacttc    660
atccctctga caatcatcag catcatgtat ggcatgtga tccgaactat ttggattaaa    720
agcaaaacct acgaaacagt gattccaac tgctcagatg ggaaactgtg cagcagctat    780
aaccgaggac tcattctaaa ggcaaaaatc aaggctrtca agtatagcat catcatcatt    840
cttgccctca tctgctgttg gagtcatac ttctgtttg acattttgga caatttcaac    900
ctccttccag acaccagga gcttttctat gcctctgtga tcattcagaa cctgccagca    960
ttgaatagt ccatcaaccc cctcatctac tgtgtcttca gcagctccat ctctttcccc   1020
tgcagggagc gaagatcaca ggattccaga atgacgttcc gggagagAAC cgagaggcat   1080
gagatgcaga ttctgtccaa gccagaattc atc                               1113

```

27/95

<210> 53

<211> 371

<212> PRT

<213> Human

<400> 53

```

Met Pro Ala Asn Phe Thr Glu Gly Ser Phe Asp Ser Ser Gly Thr Gly
          5              10              15
Gln Thr Leu Asp Ser Ser Pro Val Ala Cys Thr Glu Thr Val Thr Phe
          20              25              30
Thr Glu Val Val Glu Gly Lys Glu Trp Gly Ser Phe Tyr Tyr Ser Phe
          35              40              45
Lys Thr Glu Gln Leu Ile Thr Leu Trp Val Leu Phe Val Phe Thr Ile
          50              55              60
Val Gly Asn Ser Val Val Leu Phe Ser Thr Trp Arg Arg Lys Lys Lys
          65              70              75              80
Ser Arg Met Thr Phe Phe Val Thr Gln Leu Ala Ile Thr Asp Ser Phe
          85              90              95
Thr Gly Leu Val Asn Ile Leu Thr Asp Ile Asn Trp Arg Phe Thr Gly
          100             105             110
Asp Phe Thr Ala Pro Asp Leu Val Cys Arg Val Val Arg Tyr Leu Gln
          115             120             125
Val Val Leu Leu Tyr Ala Ser Thr Tyr Val Leu Val Ser Leu Ser Ile
          130             135             140
Asp Arg Tyr His Ala Ile Val Tyr Pro Met Lys Phe Leu Gln Gly Glu
          145             150             155             160
Lys Gln Ala Arg Val Leu Ile Val Ile Ala Trp Ser Leu Ser Phe Leu
          165             170             175
Phe Ser Ile Pro Thr Leu Ile Ile Phe Gly Lys Arg Thr Leu Ser Asn

```

28/95

	180		185		1										
Gly	Glu	Val	Gln	Cys	Trp	Ala	Leu	Trp	Pro	Asp	Asp	Ser	Tyr	Trp	Thr
	195						200					205			
Pro	Tyr	Met	Thr	Ile	Val	Ala	Phe	Leu	Val	Tyr	Phe	Ile	Pro	Leu	Thr
	210						215					220			
Ile	Ile	Ser	Ile	Met	Tyr	Gly	Ile	Val	Ile	Arg	Thr	Ile	Trp	Ile	Lys
225					230					235					240
Ser	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Val	Ile	Ser	Asn	Cys	Ser	Asp	Gly	Lys	Leu
			245						250					255	
Cys	Ser	Ser	Tyr	Asn	Arg	Gly	Leu	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Ile	Lys	Ala
	260						265					270			
Ile	Lys	Tyr	Ser	Ile	Ile	Ile	Ile	Leu	Ala	Phe	Ile	Cys	Cys	Trp	Ser
	275						280					285			
Pro	Tyr	Phe	Leu	Phe	Asp	Ile	Leu	Asp	Asn	Phe	Asn	Leu	Leu	Pro	Asp
	290					295				300					
Thr	Gln	Glu	Arg	Phe	Tyr	Ala	Ser	Val	Ile	Ile	Gln	Asn	Leu	Pro	Ala
305					310					315					320
Leu	Asn	Ser	Ala	Ile	Asn	Pro	Leu	Ile	Tyr	Cys	Val	Phe	Ser	Ser	Ser
			325						330				335		
Ile	Ser	Phe	Pro	Cys	Arg	Glu	Gln	Arg	Ser	Gln	Asp	Ser	Arg	Met	Thr
	340					345						350			
Phe	Arg	Glu	Arg	Thr	Glu	Arg	His	Glu	Met	Gln	Ile	Leu	Ser	Lys	Pro
	355					360						365			
Glu	Phe	Ile													
	370														

<210> 54

<211> 1113

<212> DNA

29/95

<213> Human

<400> 54

```

atgccagcca acttcacaga gggcagcttc gattccagtg ggaccgggca gacgctggat    60
tcttccccag tggcttgac tgaaacagtg acttttactg aagtgggtgga aggaaaggaa   120
tggggttcc tctactactc cttaagact gagcaattga taactctgtg ggtcctcttt   180
gttttiacca ttgttgaaa ctccgttgig cttttttcca catggaggag aaagaagaag   240
tcaagaatga cttctttgt gactcagctg gccatcacag attctttcac aggactggtc   300
aacatcttga cagatattaa ttggcgattc actggagact tcacggcacc tgacctgggt   360
tgccgagtgg tccgctatit gcaggttgig ctgctctacg cctctaccta cgtcctgggt   420
tccctcagca tagacagata ccatgccatc gtctacccca tgaagtccct tcaaggagaa   480
aagcaagcca gggtcctcat tigtatgcc tggagcctgt cttttctgtt ctccattccc   540
acctgatca tatitgggaa gaggacactg tccaacggig aagtgcagtg ctgggccctg   600
tgccctgacg actcctactg gacccatac atgaccatcg tggccttcc tgggtacttc   660
atccctctga caatcatcag catcatgtat ggcatgtga tccgaactat ttggattaaa   720
agcaaaacct acgaaacagt gatttccaac tgctcagatg ggaaactgtg cagcagctat   780
aaccgaggac tcatctcaaa ggcaaaaatc aaggctatca agtatagcat catcatcatt   840
cttgccctca tctgctgttg gattccatac ttcctgtttg acattttgga caatttcaac   900
ctccttccag acaccagga gcgtttctat gcctctgtga tcattcagaa cctgccagca   960
ttgaatagt ccatcaacc cctcatctac tgtgtcttca gcagctccat ctttttcccc  1020
tgcagggagc aaagatcaca ggattccaga atgacgttcc gggagagAAC tgagaggcat  1080
gagatgcaga ttctgtccaa gccagaattc atc                               1113

```

<210> 55

<211> 371

<212> PRT

<213> Human

<400> 55

30/95

Met Pro Ala Asn Phe Thr Glu Gly Ser Phe Asp Ser Ser (
 5 10 15
 Gln Thr Leu Asp Ser Ser Pro Val Ala Cys Thr Glu Thr Val Thr Phe
 20 25 30
 Thr Glu Val Val Glu Gly Lys Glu Trp Gly Ser Phe Tyr Tyr Ser Phe
 35 40 45
 Lys Thr Glu Gln Leu Ile Thr Leu Trp Val Leu Phe Val Phe Thr Ile
 50 55 60
 Val Gly Asn Ser Val Val Leu Phe Ser Thr Trp Arg Arg Lys Lys Lys
 65 70 75 80
 Ser Arg Met Thr Phe Phe Val Thr Gln Leu Ala Ile Thr Asp Ser Phe
 85 90 95
 Thr Gly Leu Val Asn Ile Leu Thr Asp Ile Ile Trp Arg Phe Thr Gly
 100 105 110
 Asp Phe Thr Ala Pro Asp Leu Val Cys Arg Val Val Arg Tyr Leu Gln
 115 120 125
 Val Val Leu Leu Tyr Ala Ser Thr Tyr Val Leu Val Ser Leu Ser Ile
 130 135 140
 Asp Arg Tyr His Ala Ile Val Tyr Pro Met Lys Phe Leu Gln Gly Glu
 145 150 155 160
 Lys Gln Ala Arg Val Leu Ile Val Ile Ala Trp Ser Leu Ser Phe Leu
 165 170 175
 Phe Ser Ile Pro Thr Leu Ile Ile Phe Gly Lys Arg Thr Leu Ser Asn
 180 185 190
 Gly Glu Val Gln Cys Trp Ala Leu Trp Pro Gly Asp Ser Tyr Trp Thr
 195 200 205
 Pro Tyr Met Thr Ile Val Ala Phe Leu Val Tyr Phe Ile Pro Leu Thr
 210 215 220
 Ile Ile Ser Ile Met Tyr Gly Ile Val Ile Arg Thr Ile Trp Ile Lys

31/95

225 230 235
 Ser Lys Thr Tyr Glu Thr Val Ile Ser Asn Cys Ser Asp Gly Lys Leu
 245 250 255
 Cys Ser Ser Tyr Asn Arg Gly Leu Ile Ser Lys Ala Lys Ile Lys Ala
 260 265 270
 Ile Lys Tyr Ser Ile Ile Ile Ile Leu Ala Phe Ile Cys Cys Trp Ser
 275 280 285
 Pro Tyr Phe Leu Phe Asp Ile Leu Asp Asn Phe Asn Leu Leu Pro Asp
 290 295 300
 Thr Gln Glu Arg Phe Tyr Ala Ser Val Ile Ile Gln Asn Leu Pro Ala
 305 310 315 320
 Leu Asn Ser Ala Ile Asn Pro Pro Ile Tyr Cys Val Phe Ser Ser Ser
 325 330 335
 Ile Ser Phe Pro Cys Arg Glu Gln Arg Ser Gln Asp Ser Arg Met Thr
 340 345 350
 Phe Arg Glu Arg Thr Glu Arg His Glu Met Gln Ile Leu Ser Lys Pro
 355 360 365
 Glu Phe Ile
 370

<210> 56

<211> 1113

<212> DNA

<213> Human

<400> 56

atgccagcca acttacaga gggcagcttc gattccagtg ggaccgggca gacgctggat 60
 tcttccccag tggcttgac tgaacagtg acttttactg aagtgggtgga aggaaaggaa 120
 tggggttcct tctactactc cttaagact gagcaattga taactctgtg ggtcctcttt 180

32/95

gtttttacc a ttgttgaaa ctccgttgtg cttttttcca catggagg
 tcaagaatga ctttcttltg gactcagctg gccatcacag attctttcac aggactggtc 300
 aacatcttga cagatattat ttggcgattc actggagact tcacggcacc tgacctgggt 360
 tgccgagtgg tccgctatit gcaggttgtg ctgctctacg cctctacctt cgtcctgggtg 420
 tccctcagca tagacagata ccatgccatc gtctacccca tgaagttcct tcaaggagaa 480
 aagcaagcca gggtcctcat tgtgatcgcc tggagcctgt cttttctgtt ctccattccc 540
 accctgatca tatttgggaa gaggacactg tccaacgggtg aagtgcagtg ctgggccctg 600
 tggcctggcg actcctactg gaccccatac atgaccatcg tggccttctt ggtgtacttc 660
 atccctctga caatcatcag catcatgtat ggcatltgtg tccgaactat ttggattaaa 720
 agcaaaacct acgaaacagt gatttccaac tgctcagatg ggaaactgtg cagcagctat 780
 aaccgaggac tcatctcaaa ggcaaaaatc aaggctatca agtatagcat tatcatcatt 840
 ctgaccttca tctgtgtgtg gattccatac ttctgtttg acattttgga caatttcaac 900
 ctcttccag acaccagga gcttttctat gcctctgtga tcattcagaa cctgccagca 960
 ttgaatagtg ccatcaacc cccatctac tgtgtcttca gcagctccat ctctttcccc 1020
 tgcagggagc aaagatcaca ggattccaga atgacgttcc gggagagaac tgagaggcat 1080
 gagatgcaga ttctgtccaa gccagaattc atc 1113

<210> 57

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 57

cttaacaaga acaaaaggcc acag 24

<210> 58

33/95

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 58

ttattcattg ctttgctctt cgaaat 26

<210> 59

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 59

ccacccaagc aggctcagac agcgag 26

<210> 60

<211> 353

<212> DNA

<213> Rat

<400> 60

ccacccaagc aggctcagac agcgagcgtg aggaatttgg caataaaaac ccatctgcac 60

agatctcgga aaatccaaaa tgattggctc attaaaactc aacctcatct tagctctgtc 120

34/95

```

gctgtccgtg gtacacgtga ttggagtta tccggtcctc tcttccaa
gccgtgattac tttctcattt tgctgagtac ctgccagcc aggctggagg ggagcgacgg 240
gctagctttt ctaaagccaa ttttgagaa gacgtcgatg aaaaggtcct ttcgcaacgg 300
agtcggctca ggggtgaaaa aaacttcatt tcgaagagca aagcaatgaa taa 353

```

<210> 61

<211> 89

<212> PRT

<213> Rat

<400> 61

```

Met Ile Gly Ser Leu Lys Leu Asn Leu Ile Leu Ala Leu Ser Leu Ser
      5              10              15
Val Val His Val Ile Trp Ser Tyr Pro Val Leu Ser Ser Lys Val Pro
      20              25              30
Gly Lys Pro Asp Tyr Phe Leu Ile Leu Leu Ser Thr Cys Pro Ala Arg
      35              40              45
Leu Glu Gly Ser Asp Gly Leu Ala Phe Leu Lys Pro Ile Leu Glu Lys
      50              55              60
Thr Ser Met Lys Arg Ser Phe Arg Asn Gly Val Gly Ser Gly Val Lys
      65              70              75              80
Lys Thr Ser Phe Arg Arg Ala Lys Gln
      85

```

<210> 62

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

35/95

<220>

<221> MUTAGEN

<222> 10

<223> Nle

<400> 62

Ser Phe Arg Asn Gly Val Gly Thr Gly Xaa Lys Lys Thr Ser Tyr Gln
5 10 15
Arg Ala Lys Ser
20

<210> 63

<211> 371

<212> PRT

<213> Human

<400> 63

Met Pro Ala Asn Phe Thr Glu Gly Ser Phe Asp Ser Ser Gly Thr Gly
5 10 15
Gln Thr Leu Asp Ser Ser Pro Val Ala Cys Thr Glu Thr Val Thr Phe
20 25 30
Thr Glu Val Val Glu Gly Lys Glu Trp Gly Ser Phe Tyr Tyr Ser Phe
35 40 45
Lys Thr Glu Gln Leu Ile Thr Leu Trp Val Leu Phe Val Phe Thr Ile
50 55 60
Val Gly Asn Ser Val Val Leu Phe Ser Thr Trp Arg Arg Lys Lys Lys
65 70 75 80
Ser Arg Met Thr Phe Phe Val Thr Gln Leu Ala Ile Thr Asp Ser Phe
85 90 95

36/95

Thr Gly Leu Val Asn Ile Leu Thr Asp Ile Asn Trp Arg F
 100 105 110
 Asp Phe Thr Ala Pro Asp Leu Val Cys Arg Val Val Arg Tyr Leu Gln
 115 120 125
 Val Val Leu Leu Tyr Ala Ser Thr Tyr Val Leu Val Ser Leu Ser Ile
 130 135 140
 Asp Arg Tyr His Ala Ile Val Tyr Pro Met Lys Phe Leu Gln Gly Glu
 145 150 155 160
 Lys Gln Ala Arg Val Leu Ile Val Ile Ala Trp Ser Leu Ser Phe Leu
 165 170 175
 Phe Ser Ile Pro Thr Leu Ile Ile Phe Gly Lys Arg Thr Leu Ser Asn
 180 185 190
 Gly Glu Val Gln Cys Trp Ala Leu Trp Pro Asp Asp Ser Tyr Trp Thr
 195 200 205
 Pro Tyr Met Thr Ile Val Ala Phe Leu Val Tyr Phe Ile Pro Leu Thr
 210 215 220
 Ile Ile Ser Ile Met Tyr Gly Ile Val Ile Arg Thr Ile Trp Ile Lys
 225 230 235 240
 Arg Lys Thr Tyr Glu Thr Val Ile Ser Asn Cys Ser Asp Gly Lys Leu
 245 250 255
 Cys Ser Ser Tyr Asn Arg Gly Leu Ile Ser Lys Ala Lys Ile Lys Ala
 260 265 270
 Ile Lys Tyr Ser Ile Ile Ile Ile Leu Ala Phe Ile Cys Cys Trp Ser
 275 280 285
 Pro Tyr Phe Leu Phe Asp Ile Leu Asp Asn Phe Asn Leu Leu Pro Asp
 290 295 300
 Thr Gln Glu Arg Phe Tyr Ala Ser Val Ile Ile Gln Asn Leu Pro Ala
 305 310 315 320
 Leu Asn Ser Ala Ile Asn Pro Leu Ile Tyr Cys Val Phe Ser Ser Ser

37/95

	325		330	
Ile Ser Phe Pro Cys Arg Glu Gln Arg Ser Gln Asp Ser Arg Met Thr				
	340		345	350
Phe Arg Glu Arg Thr Glu Arg His Glu Met Gln Ile Leu Ser Lys Pro				
	355		360	365
Glu Phe Ile				
370				

<210> 64

<211> 1113

<212> DNA

<213> Human

<400> 64

atgccagcca acitcacaga gggcagcttc gattccagtg ggaccgggca gacgctggat	60
tcttccccag tggcittgcac tgaacacagt acitittactg aagtgggtgga aggaaaggaa	120
tggggttcct tctactactc ctttaagact gagcaattga taactctgtg ggtcctcttt	180
gtttttacca ttgttggaaa ctccgttgtg cttttttcca catggaggag aaagaagaag	240
tcaagaatga ctttctttgt gactcagctg gccatcacag attctttcac aggactggtc	300
aacatcttga cagatattaa ttggcgattc actggagact tcacggcacc tgacctggtt	360
tgccgagtgg tccgctatit gcaggttgtg ctgctctacg cctctaccta cgtcctgggtg	420
tccctcagca tagacagata ccatgccatc gtctacccca tgaagttcct tcaaggagaa	480
aagcaagcca gggtcctcat tgtgatcgcc tggagcctgt cttttctgtt ctccattccc	540
acctgatca tatttgggaa gaggacactg tccaacgggtg aagtgcagtg ctgggccttg	600
tggcctgacg actcctactg gacccatac atgaccatcg tggccttctt ggtglacttc	660
atccctctga caatcatcag catcatgtat ggcatgttga tccgaactat ttggattaaa	720
aggaaaacct acgaaacagt gatttccaac tgctcagatg ggaaactgtg cagcagctat	780
aaccgaggac tcatctcaaa ggcaaaaatc aaggctatca agtatagcat catcatcatt	840
cttgccittca tctgctgttg gattccatac ttcctgtttg acattttgga caatttcaac	900

38/95

ctccttccag acaccagga gcgtttctat gcctctgtga tcattcaga
 ttgaatagtg ccatcaaccc cctcatctac tgtgtcttca gcagctccat ctctttcccc 1020
 tgcagggagc aaagatcaca ggattccaga atgacgttcc gggagagaac tgagaggcat 1080
 gagatgcaga ttctgtccaa gccagaattc atc 1113

<210> 65

<211> 371

<212> PRT

<213> Human

<400> 65

Met	Pro	Ala	Asn	Phe	Thr	Glu	Gly	Ser	Phe	Asp	Ser	Ser	Gly	Thr	Gly
			5					10						15	
Gln	Thr	Leu	Asp	Ser	Ser	Pro	Val	Ala	Cys	Thr	Glu	Thr	Val	Thr	Phe
			20					25					30		
Thr	Glu	Val	Val	Glu	Gly	Lys	Glu	Trp	Gly	Ser	Phe	Tyr	Tyr	Ser	Phe
			35				40						45		
Lys	Thr	Glu	Gln	Leu	Ile	Thr	Leu	Trp	Val	Leu	Phe	Val	Phe	Thr	Ile
			50				55				60				
Val	Gly	Asn	Ser	Val	Val	Leu	Phe	Ser	Thr	Trp	Arg	Arg	Lys	Lys	Lys
			65			70				75				80	
Ser	Arg	Met	Thr	Phe	Phe	Val	Thr	Gln	Leu	Ala	Ile	Thr	Asp	Ser	Phe
			85					90					95		
Thr	Gly	Leu	Val	Asn	Ile	Leu	Thr	Asp	Ile	Ile	Trp	Arg	Phe	Thr	Gly
			100					105					110		
Asp	Phe	Thr	Ala	Pro	Asp	Leu	Val	Cys	Arg	Val	Val	Arg	Tyr	Leu	Gln
			115				120					125			
Val	Val	Leu	Leu	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr	Val	Leu	Val	Ser	Leu	Ser	Ile
			130				135					140			

39/95

Asp Arg Tyr His Ala Ile Val Tyr Pro Met Lys Phe Leu (
 145 150 155 160
 Lys Gln Ala Arg Val Leu Ile Val Ile Ala Trp Ser Leu Ser Phe Leu
 165 170 175
 Phe Ser Ile Pro Thr Leu Ile Ile Phe Gly Lys Arg Thr Leu Ser Asn
 180 185 190
 Gly Glu Val Gln Cys Trp Ala Leu Trp Pro Asp Asp Ser Tyr Trp Thr
 195 200 205
 Pro Tyr Met Thr Ile Val Ala Phe Leu Val Tyr Phe Ile Pro Leu Thr
 210 215 220
 Ile Ile Ser Ile Met Tyr Gly Ile Val Ile Arg Thr Ile Trp Ile Lys
 225 230 235 240
 Arg Lys Thr Tyr Glu Thr Val Ile Ser Asn Cys Ser Asp Gly Lys Leu
 245 250 255
 Cys Ser Ser Tyr Asn Arg Gly Leu Ile Ser Lys Ala Lys Ile Lys Ala
 260 265 270
 Ile Lys Tyr Ser Ile Ile Ile Ile Leu Ala Phe Ile Cys Cys Trp Ser
 275 280 285
 Pro Tyr Phe Leu Phe Asp Ile Leu Asp Asn Phe Asn Leu Leu Pro Asp
 290 295 300
 Thr Gln Glu Arg Phe Tyr Ala Ser Val Ile Ile Gln Asn Leu Pro Ala
 305 310 315 320
 Leu Asn Ser Ala Ile Asn Pro Leu Ile Tyr Cys Val Phe Ser Ser Ser
 325 330 335
 Ile Ser Phe Pro Cys Arg Glu Gln Arg Ser Gln Asp Ser Arg Met Thr
 340 345 350
 Phe Arg Glu Arg Thr Glu Arg His Glu Met Gln Ile Leu Ser Lys Pro
 355 360 365
 Glu Phe Ile

40/95

370

<210> 66

<211> 1113

<212> DNA

<213> Human

<400> 66

```

atgccagcca acttcacaga gggcagcttc gattccagtg ggaccgggca gacgctggat    60
tcttccccag tggcttgac  tgaacacagt acttttactg aagtgggtgga aggaaaggaa   120
tggggttcct tctactactc ctttaagact gagcaattga taactctgtg ggtcctcttt   180
gtttttacca ttgttggaaa ctccgttgtg cttttttcca catggaggag aaagaagaag   240
tcaagaatga ccttctttgt gactcagctg gccatcacag attctttcac aggactggtc   300
aacatcttga cagatattat ttggcgattc actggagact tcacggcacc tgacctgggt   360
tgccgagigg tccgctattt gcaggttgtg ctgctctacg cctctaccta cgtcctgggt   420
tccctcagca tagacagata ccatgccatc gtctacccca tgaagtccct tcaaggagaa   480
aagcaagcca gggtcctcat tgtgatcgcc tggagcctgt cttttctgtt ctccattccc   540
acctgatca tatttgggaa gaggacactg tccaacggtg aagtgcagtg ctgggccctg   600
tggcctgacg actcctactg gaccccatc atgaccatcg tggccttcct ggtglacttc   660
atccctctga caatcatcag catcatgtat ggcatgtgta tccgaactat ttggattaaa   720
aggaaaacct acgaaacagt gatttccaac tgcctcagatg ggaaactgtg cagcagctat   780
aaccgaggac tcattctcaa ggcaaaaatc aaggctatca agtatagcat catcatcatt   840
cttgccitca tctgctgttg gagtccatac ttectgtttg acattttgga caatttcaac   900
ctccttccag acaccagga gcgtttctat gcctctgtga tcattcagaa cctgccagca   960
ttgaatagtg ccatcaacct cctcatctac tgtgtcttca gcagctccat ctctttcccc  1020
tgcagggagc aaagatcaca ggattccaga atgacgttcc gggagagaac tgagaggcat  1080
gagatgcaga ttctgtccaa gccagaattc atc                                1113

```

<210> 67

41/95

<211> 371

<212> PRT

<213> Human

<400> 67

```

Met Pro Ala Asn Phe Thr Glu Gly Ser Phe Asp Ser Ser Gly Thr Gly
          5              10              15
Gln Thr Leu Asp Ser Ser Pro Val Ala Cys Thr Glu Thr Val Thr Phe
          20              25              30
Thr Glu Val Val Glu Gly Lys Glu Trp Gly Ser Phe Tyr Tyr Ser Phe
          35              40              45
Lys Thr Glu Gln Leu Ile Thr Leu Trp Val Leu Phe Val Phe Thr Ile
          50              55              60
Val Gly Asn Ser Val Val Leu Phe Ser Thr Trp Arg Arg Lys Lys Lys
          65              70              75              80
Ser Arg Met Thr Phe Phe Val Thr Gln Leu Ala Ile Thr Asp Ser Phe
          85              90              95
Thr Gly Leu Val Asn Ile Leu Thr Asp Ile Asn Trp Arg Phe Thr Gly
          100             105             110
Asp Phe Thr Ala Pro Asp Leu Val Cys Arg Val Val Arg Tyr Leu Gln
          115             120             125
Val Val Leu Leu Tyr Ala Ser Thr Tyr Val Leu Val Ser Leu Ser Ile
          130             135             140
Asp Arg Tyr His Ala Ile Val Tyr Pro Met Lys Phe Leu Gln Gly Glu
          145             150             155             160
Lys Gln Ala Arg Val Leu Ile Val Ile Ala Trp Ser Leu Ser Phe Leu
          165             170             175
Phe Ser Ile Pro Thr Leu Ile Ile Phe Gly Lys Arg Thr Leu Ser Asn
          180             185             190

```

42/95

Gly Glu Val Gln Cys Trp Ala Leu Trp Pro Asp Asp Ser 1
 195 200 205
 Pro Tyr Met Thr Ile Val Ala Phe Leu Val Tyr Phe Ile Pro Leu Thr
 210 215 220
 Ile Ile Ser Ile Met Tyr Gly Ile Val Ile Arg Thr Ile Trp Ile Lys
 225 230 235 240
 Ser Lys Thr Tyr Glu Thr Val Ile Ser Asn Cys Ser Asp Gly Lys Leu
 245 250 255
 Cys Ser Ser Tyr Asn Arg Gly Leu Ile Ser Lys Ala Lys Ile Lys Ala
 260 265 270
 Ile Lys Tyr Ser Ile Ile Ile Ile Leu Ala Phe Ile Cys Cys Trp Ser
 275 280 285
 Pro Tyr Phe Leu Phe Asp Ile Leu Asp Asn Phe Asn Leu Leu Pro Asp
 290 295 300
 Thr Gln Glu Arg Phe Tyr Ala Ser Val Ile Ile Gln Asn Leu Pro Ala
 305 310 315 320
 Leu Asn Ser Ala Ile Asn Pro Leu Ile Tyr Cys Val Phe Ser Ser Ser
 325 330 335
 Ile Ser Phe Pro Cys Arg Glu Gln Arg Ser Gln Asp Ser Arg Met Thr
 340 345 350
 Phe Arg Glu Arg Thr Glu Arg His Glu Met Gln Ile Leu Ser Lys Pro
 355 360 365
 Glu Phe Ile
 370

<210> 68

<211> 1113

<212> DNA

<213> Human

43/95

<400> 68

```

atgccagcca acttcacaga gggcagcttc gattccagtg ggaccgggca gacgctggat    60
tcttccccag tggcttgcac tgaacacagt acttttactg aagtgggtga aggaaaggaa   120
tggggttcct tctactactc cttaagact gagcaattga taactctgtg ggtcctcttt   180
gtttttacca ttgttggaac ctccgttgtg cttttttcca catggaggag aaagaagaag   240
tcaagaatga ctttctttgt gactcagctg gccatcacag attctttcac aggactggtc   300
aacatcttga cagatattaa ttggcgatc actgggagact tcacggcacc tgacctggtt   360
tgccgagtgg tccgctatit gcaggttgtg ctgctctacg cctctaccta cgtccttggtg   420
tccctcagca tagacagata ccatgccatc gtctacccca tgaagttcct tcaaggagaa   480
aagcaagcca gggctctcat tgtgatcgcc tggagcctgt cttttctgtt ctccattccc   540
acctgatca tatttgggaa gaggacactg tccaacggtg aagtgcagtg ctgggccctg   600
tggcctgacg actcctactg gaccccatc atgaccatcg tggccttctt ggtgtacttc   660
atccctctga caatcatcag catcatgtat ggcatltgtg tccgaactat ttggattaaa   720
agcaaaacct acgaaacagt gatticcaac tgctcagatg ggaaactgtg cagcagctat   780
aaccgaggac tcattctcaa ggcaaaaatc aaggctatca agtatagcat catcatcatt   840
cttgccctca tctgctgttg gattccatac ttctgtttg acattttgga caatttcaac   900
ctccttccag acaccagga gcgtttctat gcctctgtga tcattcagaa cctgccagca   960
ttgaatagtg ccatcaacct cctcatctac tgtgtcttca gcagctccat ctctttcccc 1020
tgcagggagc aaagatcaca ggattccaga atgacgttcc gggagagAAC tgagaggcat 1080
gagatgcaga ttctgtccaa gccagaattc atc                                1113

```

<210> 69

<211> 348

<212> PRT

<213> Human

<400> 69

Met Pro Ala Asn Phe Thr Glu Gly Ser Phe Asp Ser Ser Gly Thr Gly

44/95

	5	10		
Gln Thr Leu Asp Ser Ser Pro Val Ala Cys Thr Glu Ala Val Thr Phe				
	20	25	30	
Thr Glu Val Val Lys Gly Lys Glu Trp Gly Ser Phe Tyr Tyr Ser Phe				
	35	40	45	
Lys Thr Glu Gln Leu Ile Thr Leu Trp Val Leu Phe Val Phe Thr Ile				
	50	55	60	
Val Gly Asn Ser Val Val Leu Phe Ser Thr Trp Arg Arg Lys Lys Lys				
65	70	75	80	
Ser Arg Met Thr Phe Phe Val Thr Gln Leu Ala Ile Thr Asp Ser Phe				
	85	90	95	
Thr Gly Leu Val Asn Ile Leu Thr Asp Ile Ile Trp Arg Phe Thr Gly				
	100	105	110	
Asp Phe Thr Ala Pro Asp Leu Val Cys Arg Val Val Arg Tyr Leu Gln				
	115	120	125	
Val Val Leu Leu Tyr Ala Ser Thr Tyr Val Leu Val Ser Leu Ser Ile				
	130	135	140	
Asp Arg Tyr His Ala Ile Val Tyr Pro Met Lys Phe Leu Gln Gly Glu				
145	150	155	160	
Lys Gln Ala Arg Val Leu Ile Val Ile Ala Trp Ser Leu Ser Phe Leu				
	165	170	175	
Phe Ser Ile Pro Thr Leu Ile Ile Phe Gly Lys Arg Thr Leu Ser Asn				
	180	185	190	
Gly Glu Val Gln Cys Trp Ala Leu Trp Pro Asp Asp Ser Tyr Trp Thr				
	195	200	205	
Pro Tyr Met Thr Ile Val Ala Phe Leu Val Tyr Phe Ile Pro Leu Thr				
	210	215	220	
Ile Ile Ser Ile Met Tyr Gly Ile Val Ile Arg Thr Ile Trp Ile Lys				
225	230	235	240	

45/95

Arg Lys Thr Tyr Glu Thr Val Ile Ser Asn Cys Ser Asp (
 245 250 255
 Cys Ser Ser Tyr Asn Arg Gly Leu Ile Ser Lys Ala Lys Ile Lys Ala
 260 265 270
 Ile Lys Tyr Ser Ile Ile Ile Ile Leu Ala Phe Ile Cys Cys Trp Ser
 275 280 285
 Pro Tyr Phe Leu Phe Asp Ile Leu Asp Asn Phe Asn Leu Leu Pro Asp
 290 295 300
 Thr Gln Glu Arg Phe Tyr Ala Ser Val Ile Ile Gln Asn Leu Pro Ala
 305 310 315 320
 Leu Asn Ser Ala Ile Asn Pro Leu Ile Tyr Cys Val Phe Ser Ser Ser
 325 330 335
 Ile Ser Phe Pro Cys Arg Ile Ile Asp Gly Asn Asp
 340 345

<210> 70

<211> 1044

<212> DNA

<213> Human

<400> 70

atgccagcca acttcacaga gggcagcttc gattccagtg ggaccgggca gacgctggat 60
 tcttccccag tggcttgca c tgaagcagtg acttttactg aagtgggtgaa aggaaaggaa 120
 tggggttcct tctactactc cttaagact gagcaattga taactctgtg ggtcctcttt 180
 gtttttacca ttgttggaaa ctccgttgtg cttttttcca catggaggag aaagaagaag 240
 tcaagaatga ctttctttgt gactcagctg gccatcacag attctttcac aggactggtc 300
 aacatcttga cagatattat ttggcgattc accggagact tcacggcacc tgacctggtt 360
 tgccgagtgg tccgctatit gcaggttgtg ctgctgtacg cctctaccta cgtcctgggtg 420
 tccctcagca tagacagata ccatgccatc gtctacccca tgaagttcct tcaaggagaa 480

46/95

```

aagcaagcca gggtcctcat tgtgatcgcc tggagcctgt cttttctg|
acctgatca tatttgggaa gaggacactg tccaacgggtg aagtgcagtg ctgggccctg 600
tggcctgacg actcctactg gacccatac atgaccatcg tggccttcct ggtgtacttc 660
atccctctga caatcatcag catcatgtat ggcatgtga tccgaactat ttggattaaa 720
aggaaaacct acgaaacagt gatttccaac tgctcagatg ggaaactgtg cagcagctat 780
aaccgaggac tcattctcaa ggcaaaaatc aaggctatca agtatagcat catcatcatt 840
cttgccctca tctgctgttg gattccatac ttctgtttg acattttgga caatttcaac 900
ctccttcag acaccagga gcgtttctat gcctctgtga tcattcagaa cctgccagca 960
ttgaatagtg ccatcaacct cctcatctac tgtgtcttca gcagctccat ctctttcccc 1020
tgcaggatca tagatggaaa tgac 1044

```

<210> 71

<211> 353

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 71

```

Met Pro Ala Asn Leu Thr Glu Gly Ser Phe His Ala Asn Gln Thr Val
      5              10              15
Pro Met Leu Asp Ser Ser Pro Val Ala Cys Thr Glu Ile Val Thr Phe
      20              25              30
Thr Glu Ala Leu Val Ala Glu Glu Trp Gly Ser Phe Tyr Ser Ser Phe
      35              40              45
Lys Thr Glu Gln Leu Ile Thr Leu Trp Val Leu Phe Val Val Thr Ile
      50              55              60
Val Gly Asn Ser Val Val Leu Phe Ser Thr Cys Arg Arg Lys Arg Lys
      65              70              75              80
Ser Arg Met Thr Phe Phe Val Thr Gln Leu Ala Ile Thr Gly Asp Phe
      85              90              95

```

47/95

Met Ala Pro Asp Leu Val Cys Arg Val Val Arg Tyr Leu C
 100 105 110
 Leu Leu Tyr Ala Ser Thr Tyr Val Leu Val Ser Leu Ser Ile Asp Arg
 115 120 125
 Tyr His Ala Ile Val Tyr Pro Met Lys Phe Leu Gln Gly Glu Lys Gln
 130 135 140
 Ala Lys Val Leu Ile Gly Ile Ala Trp Ser Leu Ser Phe Leu Phe Ser
 145 150 155 160
 Ile Pro Thr Leu Ile Ile Phe Gly Lys Arg Thr Leu Ser Asn Gly Glu
 165 170 175
 Val Gln Cys Trp Ala Leu Trp Pro Asp Asp Ser Tyr Trp Thr Pro Tyr
 180 185 190
 Met Thr Ile Val Ala Phe Leu Val Tyr Phe Ile Pro Leu Ala Ile Ile
 195 200 205
 Ser Val Ile Tyr Gly Leu Val Ile Arg Thr Ile Trp Met Lys Ser Lys
 210 215 220
 Thr His Glu Thr Val Ile Ser Asn Cys Ser Asp Gly Lys Leu Cys Cys
 225 230 235 240
 Ser Tyr Asn Arg Gly Leu Ile Ser Lys Ala Lys Ile Lys Ala Ile Lys
 245 250 255
 Tyr Ser Ile Val Ile Ile Leu Ala Phe Ile Cys Cys Trp Ser Pro Tyr
 260 265 270
 Phe Leu Phe Asp Ile Leu Asp Asn Phe Asn Val Leu Pro Asp Thr Lys
 275 280 285
 Glu Arg Phe Tyr Ala Ser Val Ile Ile Gln Asn Leu Pro Ala Leu Asn
 290 295 300
 Ser Ala Ile Asn Pro Leu Ile Tyr Cys Ile Phe Ser Ser Ser Ile Cys
 305 310 315 320
 Ser Pro Cys Lys Met Gln Arg Ser Gln Asp Ser Arg Met Thr Tyr Arg

48/95

325

330

Glu Arg Ser Glu Arg His Glu Met Gln Ile Leu Ser Lys Pro Glu Phe

340

345

350

Ile

<210> 72

<211> 1059

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 72

```

atgccagcca acctcacaga gggcagcitt catgccaacc agactgtgcc gatgctagat    60
tcttccccag tagcttgcac tgaaattgtg acgttccactg aagcactggg ggctgaggag    120
tggggctcct tctactcctc cttaagaca gaacagctga taacctgtg ggctctgttt    180
gtcgtcacta ttgtgggaaa ctctgttgtg ctgttctcca cgtgcagaag aaaaagaaag    240
tccagaatga ctttctttgt gacacaattg gccatcacag gagacttcat ggcccctgac    300
ctggtttgca gagtcgtccg ctacttgcag gtgttcctgc tgtatgccic tacctacgtc    360
ctgggtgccc tcagcataga cagataccat gccatcgttt accccatgaa gtttcttcaa    420
ggagagaagc aagccaaagt cctcatcgga atagcgtgga gcctctcggt cctgttctcc    480
attcccacgc tgatcatatt tgggaaaagg acactttcca atggtgaggt gcagtgtcgg    540
gcactgtggc cggatgactc ctactggacc ccgtacaiga ccatcgtcgc ctttctgggtg    600
tacttcattc ccttggcaat tctcagcgtt atctatggcc ttgtgatccg aactatttgg    660
atgaaaagca aaacccatga gacggtgatt tccaactgct cagatggcaa actatgctgc    720
agctacaacc gagggctcat ctctaaggca aaaatcaagg ccatcaagta tagcatcgtc    780
ataatccittg ctttcatctg ctgctggagc ccatacttcc tctttgacat attagacaac    840
ttcaacgtcc ttccagacac caaggagcgt ttctatgcct ctgtgattat ccagaacctg    900
cccgcccttga acagtgccat taacccccic atctactgca tcttcagcag ctccatctgc    960
tccccctgca agatgcaaag atcacaggat tccagaatga cataccgaga gagaagcgag   1020
agacacgaga tgcagattct ctccaagccg gaattcatc                               1059

```


49/95

<210> 73

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding mouse TGR2
3-A

<400> 73

tgcagagaca gtgagacctg a 21

<210> 74

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding mouse TGR2
3-A

<400> 74

aagttcagcc tagcactact gcct 24

<210> 75

<211> 371

<212> PRT

<213> Mouse

50/95

<400> 75

Met	Pro	Ala	Asn	Leu	Thr	Glu	Gly	Ser	Phe	His	Ala	Asn	Gln	Thr	Val
				5					10					15	
Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Ser	Pro	Val	Ala	Cys	Thr	Glu	Ile	Val	Thr	Phe
				20				25					30		
Thr	Glu	Ala	Leu	Val	Ala	Glu	Glu	Trp	Gly	Ser	Phe	Tyr	Ser	Ser	Phe
			35					40					45		
Lys	Thr	Glu	Gln	Leu	Ile	Thr	Leu	Trp	Val	Leu	Phe	Val	Val	Thr	Ile
		50				55					60				
Val	Gly	Asn	Ser	Val	Val	Leu	Phe	Ser	Thr	Cys	Arg	Arg	Lys	Arg	Lys
		65				70				75					80
Ser	Arg	Met	Thr	Phe	Phe	Val	Thr	Gln	Leu	Ala	Ile	Thr	Asp	Ser	Phe
				85					90					95	
Thr	Gly	Leu	Ile	Asn	Ile	Leu	Thr	Asp	Ile	Ile	Trp	Arg	Phe	Thr	Gly
			100					105					110		
Asp	Phe	Met	Ala	Pro	Asp	Leu	Val	Cys	Arg	Val	Val	Arg	Tyr	Leu	Gln
			115					120				125			
Val	Val	Leu	Leu	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr	Val	Leu	Val	Ser	Leu	Ser	Ile
			130				135					140			
Asp	Arg	Tyr	His	Ala	Ile	Val	Tyr	Pro	Met	Lys	Phe	Leu	Gln	Gly	Glu
		145				150				155					160
Lys	Gln	Ala	Lys	Val	Leu	Ile	Gly	Ile	Ala	Trp	Ser	Leu	Ser	Phe	Leu
			165						170					175	
Phe	Ser	Ile	Pro	Thr	Leu	Ile	Ile	Phe	Gly	Lys	Arg	Thr	Leu	Ser	Asn
			180					185					190		
Gly	Glu	Val	Gln	Cys	Trp	Ala	Leu	Trp	Pro	Asp	Asp	Ser	Tyr	Trp	Thr
			195				200					205			
Pro	Tyr	Met	Thr	Ile	Val	Ala	Phe	Leu	Val	Tyr	Phe	Ile	Pro	Leu	Ala

51/95

210	215	220
Ile Ile Ser Val Ile Tyr Gly Leu Val Ile Arg Thr Ile Trp Met Lys		
225	230	235
Ser Lys Thr His Glu Thr Val Ile Ser Asn Cys Ser Asp Gly Lys Leu		
	245	250
		255
Cys Cys Ser Tyr Asn Arg Gly Leu Ile Ser Lys Ala Lys Ile Lys Ala		
	260	265
		270
Ile Lys Tyr Ser Ile Val Ile Ile Leu Ala Phe Ile Cys Cys Trp Ser		
	275	280
		285
Pro Tyr Phe Leu Phe Asp Ile Leu Asp Asn Phe Asn Val Leu Pro Asp		
	290	295
		300
Thr Lys Glu Arg Phe Tyr Ala Ser Val Ile Ile Gln Asn Leu Pro Ala		
	305	310
		315
Leu Asn Ser Ala Ile Asn Pro Leu Ile Tyr Cys Ile Phe Ser Ser Ser		
	325	330
		335
Ile Cys Ser Pro Cys Lys Met Gln Arg Ser Gln Asp Ser Arg Met Thr		
	340	345
		350
Tyr Arg Glu Arg Ser Glu Arg His Glu Met Gln Ile Leu Ser Lys Pro		
	355	360
		365
Glu Phe Ile		
370		

<210> 76

<211> 1113

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 76

atgccagcca acctcacaga gggcagcttt catgcccaacc agactgtgcc gatgctagat 60

52/95

```

tcttccccag tagcttgca c tgaattgtg acgttactg aagcactge
tggggctect tctactcct c tttaagaca gaacagctga taacctgig ggtcctgttt 180
gtcgtcacta ttgtgggaaa ctcgtttgtg ctgttctcca cgtgcagaag aaaaagaaag 240
tccagaatga ctttctttgt gacacaattg gccatcacag actccttcac gggcctgac 300
aacatcttga cagacattat ttggcgattc acaggagact tcatggcccc tgacctggtt 360
tgcagagtcg tccgtactt gcaggttgtc ctgctgtatg cctctaccta cgtcctgggtg 420
tccctcagca tagacagata ccatgccatc gtttacccca tgaagtttct tcaaggagag 480
aagcaagcca aagtcctcat cggaatagcg tggagcctct cgttctgtt ctccattccc 540
acgcigatca tatttgggaa aaggacactt tccaatgggtg aggtgcagtg ctgggcactg 600
tggccggatg actcctactg gaccccgta c atgaccatg tgcctttct ggtgtacttc 660
attcccttgg caattatcag cgttatctat ggcttgtga tccgaactat ttggatgaaa 720
agcaaaaccc atgagacggt gatttccaac tgctcagatg gcaaaactat ctgcagctac 780
aaccgagggc tcatctctaa ggcaaaaatc aaggccatca agtatagcat cgtcataatc 840
cttgccttca tctgctgctg gagcccatc ttcctctttg acatattaga caacttcaac 900
gtccttccag acaccaagga gcgtttctat gcctctgtga ttatccagaa cctgcccgcc 960
ttgaacagtg ccattaaccc cctcatctac tgcatcttca gcagctccat ctgctccccc 1020
tgcaagatgc aaagatcaca ggattccaga atgacatacc gagagagaag cgagagacac 1080
gagatgcaga ttctctccaa gccggaattc atc 1113

```

<210> 77

<211> 371

<212> PRT

<213> Rat

<400> 77

Met Pro Ala Asn Leu Thr Glu Gly Ser Phe His Ala Asn Gln Thr Val

5

10

15

Pro Met Leu Asp Ser Ser Pro Val Ala Cys Thr Glu Ile Val Thr Phe

20

25

30

53/95

Thr Glu Ala Leu Glu Ala Glu Glu Trp Gly Ser Phe Tyr S
 35 40 45
 Lys Thr Glu Gln Leu Ile Thr Leu Trp Val Leu Phe Val Phe Thr Ile
 50 55 60
 Val Gly Asn Ser Val Val Leu Phe Ser Thr Trp Arg Arg Lys Arg Lys
 65 70 75 80
 Ser Arg Met Thr Phe Phe Val Thr Gln Leu Ala Ile Thr Asp Ser Phe
 85 90 95
 Thr Gly Leu Ile Asn Ile Leu Thr Asp Ile Ile Trp Arg Phe Thr Gly
 100 105 110
 Asp Phe Met Ala Pro Asp Leu Val Cys Arg Ile Val Arg Tyr Leu Gln
 115 120 125
 Val Val Leu Leu Tyr Ala Ser Thr Tyr Val Leu Val Ser Leu Ser Ile
 130 135 140
 Asp Arg Tyr His Ala Ile Val Tyr Pro Met Lys Phe Leu Gln Gly Glu
 145 150 155 160
 Lys Gln Ala Lys Val Leu Ile Gly Ile Ala Trp Ser Leu Ser Phe Leu
 165 170 175
 Phe Ser Ile Pro Thr Leu Ile Ile Phe Gly Lys Arg Thr Leu Ser Asn
 180 185 190
 Gly Glu Val Gln Cys Trp Ala Leu Trp Pro Asp Asp Ser Tyr Trp Thr
 195 200 205
 Pro Tyr Met Thr Ile Val Ala Phe Leu Val Tyr Phe Ile Pro Leu Thr
 210 215 220
 Ile Ile Ser Val Ile Tyr Gly Leu Val Ile Arg Thr Ile Trp Ile Lys
 225 230 235 240
 Ser Lys Ala His Glu Thr Val Ile Ser Asn Cys Ser Asp Gly Glu Leu
 245 250 255
 Cys Cys Ser Tyr Asn Arg Gly Leu Ile Ser Lys Ala Lys Ile Lys Ala

54/95

260 265 270
 Ile Lys Tyr Ser Ile Val Ile Ile Leu Ala Phe Ile Cys Cys Trp Ser
 275 280 285
 Pro Tyr Phe Leu Phe Asp Met Leu Asp Asn Phe Asn Leu Leu Pro Asp
 290 295 300
 Thr Lys Glu Arg Phe Tyr Ala Ser Val Ile Ile Gln Asn Leu Pro Ala
 305 310 315 320
 Leu Asn Ser Ala Ile Asn Pro Leu Ile Tyr Cys Ile Phe Ser Gly Ser
 325 330 335
 Leu Cys Ser Pro Cys Lys Val Gln Arg Ser Gln Asp Ser Arg Met Thr
 340 345 350
 Tyr Arg Glu Arg Ser Glu Arg His Glu Met Gln Ile Leu Ser Lys Pro
 355 360 365
 Glu Phe Ile
 370

<210> 78

<211> 1113

<212> DNA

<213> Rat

<400> 78

atgccggcca acctcacaga gggcagcttt catgccaacc agactgtgcc gatgctagat 60
 tcttccccctg tagcttgcac tgaaattgtg actttcactg aagcgctgga ggctgaggag 120
 tggggctcct tctactcgtc cttaaagaca gagcagctga taacctgtg ggtcctgttt 180
 gctttcacta ttgtgggaaa ctcggtcgtg ctgtttctcca catggagaag aaaaagaaag 240
 tccagaatga ctttctttgt gactcaattg gccatcacag actccttcac aggctgatc 300
 aacatcctga cagacattat ttggcgattc acgggagact tcatggcccc tgacctggtc 360
 tgcagaatcg tccgttactt acaggttgtc ctgctttatg cctctaccta tgtcctgggt 420

55/95

```

tccctcagca tagacagata ccatgccatc gtttacccea tgaaattcc
aagcaagcca aagtcctcat cggaatagca tggagcctct ccttcctgtt ctccatcccc 540
acactgatca tatttgggaa aaggacacit tccaatggig aggtacagtg ctgggcactg 600
tggccagacg actcctactg gaccccatat atgaccatcg ttgcctttct ggtgtacttc 660
atccccittga caattatcag cgtcatctat ggccittgtga tccgaactat ttggattaaa 720
agcaaagccc atgagacggt gatticcaac tgctcagatg gagaactatg ctgcagctac 780
aaccgaggcc tcatctcaaa agcaaaaatc aaggccatca agtacagcat cgtcataatc 840
cttgctttca tctgtctgtg gattccatac ttctcttttg acatgttaga caacttcaac 900
ctccttccag acaccaagga gcgtttctat gccctctgtga ttatccagaa cctgccigcc 960
ttgaacagtg ccattaacce cctcatctac tgcatttca gcggctccct ctgctccccc 1020
tgcaagggtgc aaagatccca ggattccaga atgacgtacc gagagagaag cgagaggcat 1080
gagatgcaga ttctctccaa gcctgaattc atc 1113

```

<210> 79

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding rat TGR23

<400> 79

gtcgacatgc cggccaacct cacagagggc agcttt 36

<210> 80

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

56/95

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding rat TGR23

<400> 80

actagtttag atgaattcag gcttggagag aatctg 36

<210> 81

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding mouse TGR2
3-B and mouse TGR23-C

<400> 81

gtcgacatgc cagccaacct cacagagggc agcttt 36

<210> 82

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding mouse TGR2
3-B and mouse TGR23-C

<400> 82

actagtttag atgaattccg gcttggagag aatctg 36

57/95

<210> 83

<211> 372

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 83

Met	Pro	Ala	Asn	Leu	Thr	Glu	Gly	Ser	Phe	His	Ala	Asn	Gln	Thr	Val
				5					10					15	
Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Ser	Pro	Val	Ala	Cys	Thr	Glu	Ile	Val	Thr	Phe
			20					25					30		
Thr	Glu	Ala	Leu	Val	Ala	Glu	Glu	Trp	Gly	Ser	Phe	Tyr	Ser	Ser	Phe
			35				40					45			
Lys	Thr	Glu	Gln	Leu	Ile	Thr	Leu	Trp	Val	Leu	Phe	Val	Val	Thr	Ile
		50				55					60				
Val	Gly	Asn	Ser	Val	Val	Leu	Phe	Ser	Thr	Cys	Arg	Arg	Lys	Arg	Lys
		65			70					75				80	
Ser	Arg	Met	Thr	Phe	Phe	Val	Thr	Gln	Leu	Ala	Ile	Thr	Asp	Ser	Phe
				85						90				95	
Thr	Gly	Leu	Ile	Asn	Ile	Leu	Thr	Asp	Ile	Ile	Trp	Arg	Phe	Thr	Gly
			100						105					110	
Asp	Phe	Met	Ala	Pro	Asp	Leu	Val	Cys	Arg	Val	Val	Arg	Tyr	Leu	Gln
			115						120				125		
Val	Val	Leu	Leu	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr	Val	Leu	Val	Ser	Leu	Ser	Ile
			130						135				140		
Asp	Arg	Tyr	His	Ala	Ile	Val	Tyr	Pro	Met	Lys	Phe	Leu	Gln	Gly	Ala
			145			150				155				160	
Glu	Lys	Gln	Ala	Lys	Val	Leu	Ile	Gly	Ile	Ala	Trp	Ser	Leu	Ser	Phe
				165						170				175	

58/95

Leu Phe Ser Ile Pro Thr Leu Ile Ile Phe Gly Lys Arg
 180 185 190
 Asn Gly Glu Val Gln Cys Trp Ala Leu Trp Pro Asp Asp Ser Tyr Trp
 195 200 205
 Thr Pro Tyr Met Thr Ile Val Ala Phe Leu Val Tyr Phe Ile Pro Leu
 210 215 220
 Ala Ile Ile Ser Val Ile Tyr Gly Leu Val Ile Arg Thr Ile Trp Met
 225 230 235 240
 Lys Ser Lys Thr His Glu Thr Val Ile Ser Asn Cys Ser Asp Gly Lys
 245 250 255
 Leu Cys Cys Ser Tyr Asn Arg Gly Leu Ile Ser Lys Ala Lys Ile Lys
 260 265 270
 Ala Ile Lys Tyr Ser Ile Val Ile Ile Leu Ala Phe Ile Cys Cys Trp
 275 280 285
 Ser Pro Tyr Phe Leu Phe Asp Ile Leu Asp Asn Phe Asn Val Leu Pro
 290 295 300
 Asp Thr Lys Glu Arg Phe Tyr Ala Ser Val Ile Ile Gln Asn Leu Pro
 305 310 315 320
 Ala Leu Asn Ser Ala Ile Asn Pro Leu Ile Tyr Cys Ile Phe Ser Ser
 325 330 335
 Ser Ile Cys Ser Pro Cys Lys Met Gln Arg Ser Gln Asp Ser Arg Met
 340 345 350
 Thr Tyr Arg Glu Arg Ser Glu Arg His Glu Met Gln Ile Leu Ser Lys
 355 360 365
 Pro Glu Phe Ile
 370

<210> 84

<211> 1116

59/95

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 84

```

atgccagcca acctcacaga gggcagcitt catgccaacc agactgtgcc gatgctagat    60
tcttccccag tagcttgcac tgaaattgtg acgttacttg aagcactggt ggctgaggag    120
tggggctcct tctactcctc cttaagaca gaacagctga taacctgtg ggtcctgttt    180
gtcgtcacta ttgtgggaaa ctctgttgtg ctgttctcca cgtgcagaag aaaaagaaag    240
tccagaatga ctttctttgt gacacaattg gccatcacag actccttcac gggcctgac    300
aacatcttga cagacattat ttggcgattc acaggagact tcatggcccc tgacctggca    360
gtttgcagag tcgtccgcta ctgtcagggt gtcctgtctg atgcctctac ctacgtcctg    420
gtgtccctca gcatagacag ataccaatgcc atcgtttacc ccatgaagtt tcttcaagga    480
gagaagcaag ccaaagtcct catcggaata gcgtggagcc tctcgttcct gtctctccatt    540
cccacgctga tcatatttgg gaaaaggaca ctttccaatg gtgagggtga gtgctgggca    600
ctgtggcccg atgactccta ctggaccccg tacatgacca tcgtcgctt tctggtgtac    660
ttcatccct tggcaattat cagcgttacc tatggccttg tgatccgaac tatttggatg    720
aaaagcaaaa ccatgagac ggtgatttcc aactgctcag atggcaaact atgctgcagc    780
tacaaccgag ggctcatctc taaggcaaaa atcaaggcca tcaagtatag catcgtcata    840
atccttgctt tcatctgctg ctggagccca tacttctctt ttgacataat agacaacttc    900
aacgtccttc cagacaccaa ggagcgttcc tatgcctctg tgattatcca gaacctgccc    960
gccttgaaca gtgccattaa cccctcacc tactgcatct tcagcagctc catctgctcc   1020
ccctgcaaga tgcaaagatc acaggattcc agaatgacat accgagagag aagcgagaga   1080
cacgagatgc agattctctc caagccggaa ttcatc                               1116

```

<210> 85

<211> 371

<212> PRT

<213> Rat

60/95

<400> 85

Met	Pro	Ala	Asn	Leu	Thr	Glu	Gly	Ser	Phe	His	Ala	Asn	Gln	Thr	Val	
				5					10					15		
Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Ser	Pro	Val	Ala	Cys	Thr	Glu	Ile	Val	Thr	Phe	
				20					25					30		
Thr	Glu	Ala	Leu	Glu	Ala	Glu	Glu	Trp	Gly	Ser	Phe	Tyr	Ser	Ser	Phe	
				35					40					45		
Lys	Thr	Glu	Gln	Leu	Ile	Thr	Leu	Trp	Val	Leu	Phe	Val	Phe	Thr	Ile	
				50					55					60		
Val	Gly	Asn	Ser	Val	Val	Leu	Phe	Ser	Thr	Trp	Arg	Arg	Lys	Arg	Lys	
				65					70					75		
Ser	Arg	Met	Thr	Phe	Phe	Val	Thr	Gln	Leu	Ala	Ile	Thr	Asp	Ser	Phe	
				85					90					95		
Thr	Gly	Leu	Ile	Asn	Ile	Leu	Thr	Asp	Ile	Ile	Trp	Arg	Phe	Thr	Gly	
				100					105					110		
Asp	Phe	Met	Ala	Pro	Asp	Leu	Val	Cys	Arg	Ile	Val	Arg	Tyr	Leu	Gln	
				115					120					125		
Val	Val	Leu	Leu	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr	Val	Leu	Val	Ser	Leu	Ser	Ile	
				130					135					140		
Asp	Arg	Tyr	His	Ala	Ile	Val	Tyr	Pro	Met	Lys	Phe	Leu	Gln	Gly	Glu	
				145					150					155		
Lys	Gln	Ala	Lys	Val	Leu	Ile	Gly	Ile	Ala	Trp	Ser	Leu	Ser	Phe	Leu	
				165					170					175		
Phe	Ser	Ile	Pro	Thr	Leu	Ile	Ile	Phe	Gly	Lys	Arg	Thr	Leu	Ser	Asn	
				180					185					190		
Gly	Glu	Val	Gln	Cys	Trp	Ala	Leu	Trp	Pro	Asp	Asp	Ser	Tyr	Trp	Thr	
				195					200					205		
Pro	Tyr	Met	Thr	Ile	Val	Ala	Phe	Leu	Val	Tyr	Phe	Ile	Pro	Leu	Thr	
				210					215					220		

61/95

Ile Ile Ser Val Ile Tyr Gly Leu Val Ile Arg Thr Ile 1
 225 230 235 240
 Ser Lys Ala His Glu Thr Val Ile Ser Asn Cys Ser Asp Gly Glu Leu
 245 250 255
 Cys Cys Ser Tyr Asn Arg Gly Leu Ile Ser Lys Ala Lys Ile Lys Ala
 260 265 270
 Ile Lys Tyr Ser Ile Val Ile Ile Leu Ala Phe Ile Cys Cys Trp Ser
 275 280 285
 Pro Tyr Phe Leu Phe Asp Met Leu Asp Asn Phe Asn Leu Leu Pro Asp
 290 295 300
 Thr Lys Glu Arg Phe Tyr Ala Ser Val Ile Ile Gln Asn Leu Pro Ala
 305 310 315 320
 Leu Asn Ser Ala Ile Asn Pro Leu Ile Tyr Cys Ile Phe Ser Gly Ser
 325 330 335
 Leu Cys Ser Pro Cys Lys Val Arg Arg Ser Gln Asp Ser Arg Met Thr
 340 345 350
 Tyr Arg Glu Arg Ser Glu Arg His Glu Met Gln Ile Leu Ser Lys Pro
 355 360 365
 Glu Phe Ile
 370

<210> 86

<211> 1113

<212> DNA

<213> Rat

<400> 86

atgccggcca acctcacaga gggcagcttt catgccaacc agactgtgcc gatgctagat 60
 tcttcccttg tagcttgcac tgaaattgtg actttcactg aagcgctgga ggctgaggag 120

62/95

```

tggggctect tctactcgtc cttaagaca gagcagctga taacctgt
gtcttacta ttgtgggaaa ctgggtcgtg ctgttctcca catggagaag aaaaagaaag 240
tccagaatga ctttctttgt gactcaatig gccatcacag actccttcac aggcctgac 300
aacatcctga cagacattat ttggcgattc acgggagact tcatggcccc tgacctggtc 360
tgcagaatcg tccgtactt acaggttgtc ctgctttatg cctctacctg tgcctgggtg 420
tccctcagca tagacagata ccatgccatc gtttacccca tgaaattcct tcaaggagag 480
aagcaagcca aagtcctcat cggaatagca tggagcctct ccttctgtt ctccatcccc 540
acactgatca tatttgggaa aaggacactt tccaatgggt aggtacagt ctgggcactg 600
tggccagacg actcctactg gacccatat atgaccatcg ttgcctttct ggtgtacttc 660
atccccctga caattatcag cgtcatctat ggcttctgga tccgaactat ttggattaaa 720
agcaaagccc atgagacggt gatttccaac tgctcagatg gagaactatg ctgcagctac 780
aaccgaggcc tcatctcaaa agcaaaaatc aaggccatca agtacagcat cgtcataatc 840
cttgccttca tctgtctgtg gattccatac ttctctttg acatgttaga caacttcaac 900
ctccttccag acaccaagga gcgtttctat gcctctgtga ttatccagaa cctgcctgcc 960
ttgaacagtg ccattaaacc cctcatctac tgcatcttca gcggctccct ctgctccccc 1020
tgcaagggtg gaagatccca ggattccaga atgacgtacc gagagagaag cgagaggcat 1080
gagatgcaga ttctctccaa gcctgaattc atc 1113

```

<210> 87

<211> 371

<212> PRT

<213> Rat

<400> 87

Met Pro Ala Asn Leu Thr Glu Gly Ser Phe His Ala Asn Gln Thr Val

5

10

15

Pro Met Leu Asp Ser Ser Pro Val Ala Cys Thr Glu Ile Val Thr Phe

20

25

30

Thr Glu Ala Leu Glu Ala Glu Glu Trp Gly Ser Phe Tyr Ser Ser Phe

63/95

35	40	45
Lys Thr Glu Gln Leu Ile Thr Leu Trp Val Leu Phe Val Phe Thr Ile		
50	55	60
Val Gly Asn Ser Val Val Leu Phe Ser Thr Trp Arg Arg Lys Arg Lys		
65	70	75
Ser Arg Met Thr Phe Phe Val Thr Gln Leu Ala Ile Thr Asp Ser Phe		
85	90	95
Thr Gly Leu Ile Asn Ile Leu Thr Asp Ile Ile Trp Arg Phe Thr Gly		
100	105	110
Asp Phe Met Ala Pro Asp Leu Val Cys Arg Ile Val Arg Tyr Leu Gln		
115	120	125
Val Val Leu Leu Tyr Ala Ser Thr Tyr Val Leu Val Ser Leu Ser Ile		
130	135	140
Asp Arg Tyr His Ala Ile Val Tyr Pro Met Lys Phe Leu Gln Gly Glu		
145	150	155
Lys Gln Ala Lys Val Leu Ile Gly Ile Ala Trp Ser Leu Ser Phe Leu		
165	170	175
Phe Ser Ile Pro Thr Leu Ile Ile Phe Gly Lys Arg Thr Leu Ser Asn		
180	185	190
Gly Glu Val Gln Cys Trp Ala Leu Trp Pro Asp Asp Ser Tyr Trp Thr		
195	200	205
Pro Tyr Met Thr Ile Val Ala Phe Leu Val Tyr Phe Ile Pro Leu Thr		
210	215	220
Ile Ile Ser Val Ile Tyr Gly Leu Val Ile Arg Thr Ile Trp Ile Lys		
225	230	235
Ser Lys Ala His Glu Thr Val Ile Ser Asn Cys Ser Asp Gly Glu Leu		
245	250	255
Cys Arg Ser Tyr Asn Arg Gly Leu Ile Ser Lys Ala Lys Ile Lys Ala		
260	265	270

64/95

Ile Lys Tyr Ser Ile Val Ile Ile Leu Ala Phe Ile Cys (
 275 280 285
 Pro Tyr Phe Leu Phe Asp Met Leu Asp Asn Phe Asn Leu Leu Pro Asp
 290 295 300
 Thr Lys Glu Arg Phe Tyr Ala Ser Val Ile Ile Gln Asn Leu Pro Ala
 305 310 315 320
 Leu Asn Ser Ala Ile Asn Pro Leu Ile Tyr Cys Ile Phe Ser Gly Ser
 325 330 335
 Leu Cys Ser Pro Cys Lys Val Gln Arg Ser Gln Asp Ser Arg Met Thr
 340 345 350
 Tyr Arg Glu Arg Ser Glu Arg His Glu Met Gln Ile Leu Ser Lys Pro
 355 360 365
 Glu Phe Ile
 370

<210> 88

<211> 1113

<212> DNA

<213> Rat

<400> 88

```

atgccggcca acctcacaga gggcagcttt catgccaacc agactgtgcc gatgctagat    60
tcttccccctg tagcttgcac tgaaattgtg actttcactg aagcgctgga ggctgaggag    120
tggggctcct tctactcgtc cttaagaca gaggcagctga taacctgtg ggtcctgttt    180
gtcttcaacta ttgtgggaaa ctcggtcgtg ctgtttctcca catggagaag aaaaagaaag    240
tccagaatga ctttctttgt gactcaatg gccatcacag actccttcac aggcctgata    300
aacatcctga cagacattat ttggcgatc acgggagact tcatggcccc tgacctggtc    360
tgcagaatcg tccgctactt acaggttgtc ctgctttatg cctctaccta tgccttggtg    420
tccctcagca tagacagata ccatgccatc gtttacccca tgaaattcct tcaaggagag    480

```


65/95

```

aagcaagcca aagtcctcat cggaatagca tggagcctct ccttcctgt
acacigatca tatttgggaa aaggacactt tccaatgggt aggtacagt ctgggcactg 600
tggccagacg actcctactg gaccccatat atgaccatcg ttgcctttct ggtgtacttc 660
atccccitga caattatcag cgtcatctat ggcccttgtga tccgaactat ttggattaaa 720
agcaaagccc atgagacggt gatticcaac tgctcagatg gagaactatg ccgcagctac 780
aaccgaggcc tcatctcaaa agcaaaaatc aaggccatca agtacagcat cgtcataatc 840
cttgctttca tctgctgctg gattccatc ttcctctttg acatgttaga caacttcaac 900
ctccttccag acaccaagga gcgtttctat gcctctgtga ttatccagaa cctgcctgcc 960
ttgaacagtg ccattaaccc cctcatctac tgcatcttca gcggctccct ctgctccccc 1020
tgcaagggtc aaagatccca ggattccaga atgacgtacc gagagagaag cgagaggcat 1080
gagatgcaga ttctctccaa gctgaattc atc 1113

```

<210> 89

<211> 371

<212> PRT

<213> Rat

<400> 89

```

Met Pro Ala Asn Leu Thr Glu Gly Ser Phe His Ala Asn Gln Thr Val
          5              10              15
Pro Met Leu Asp Ser Ser Pro Val Ala Cys Thr Glu Ile Val Thr Phe
          20              25              30
Thr Glu Ala Leu Glu Ala Glu Glu Trp Gly Ser Phe Tyr Ser Ser Phe
          35              40              45
Lys Thr Glu Gln Leu Ile Thr Leu Trp Val Leu Phe Val Phe Thr Ile
          50              55              60
Val Gly Asn Ser Val Val Leu Phe Ser Thr Trp Arg Arg Lys Arg Lys
          65              70              75              80
Ser Arg Met Thr Phe Phe Val Thr Gln Leu Ala Ile Thr Asp Ser Phe

```

66/95

	85	90	
Thr Gly Leu Ile Asn Ile Leu Thr Asp Ile Ile Trp Arg Phe Thr Gly			
100	105	110	
Asp Phe Met Ala Pro Asp Leu Val Cys Arg Ile Val Arg Tyr Leu Gln			
115	120	125	
Val Val Leu Leu Tyr Ala Ser Thr Tyr Val Leu Val Ser Leu Ser Ile			
130	135	140	
Asp Arg Tyr His Ala Ile Val Tyr Pro Met Lys Phe Leu Gln Gly Glu			
145	150	155	160
Lys Gln Ala Lys Val Leu Ile Gly Ile Ala Trp Ser Leu Ser Phe Leu			
165	170	175	
Phe Ser Ile Pro Thr Leu Ile Ile Phe Gly Lys Arg Thr Leu Ser Asn			
180	185	190	
Gly Glu Val Gln Cys Trp Ala Leu Trp Pro Asp Asp Ser Tyr Trp Thr			
195	200	205	
Pro Tyr Met Thr Ile Val Ala Phe Leu Ala Tyr Phe Ile Pro Leu Thr			
210	215	220	
Ile Ile Ser Val Ile Tyr Gly Leu Val Ile Arg Thr Ile Trp Ile Lys			
225	230	235	240
Ser Lys Ala His Glu Thr Val Ile Ser Asn Cys Ser Asp Gly Glu Leu			
245	250	255	
Cys Cys Ser Tyr Asn Arg Gly Leu Ile Ser Lys Ala Lys Ile Lys Ala			
260	265	270	
Ile Lys Tyr Ser Ile Val Ile Ile Leu Ala Phe Ile Cys Cys Trp Ser			
275	280	285	
Pro Tyr Phe Leu Phe Asp Met Leu Asp Asn Phe Asn Leu Leu Pro Asp			
290	295	300	
Thr Lys Glu Arg Phe Tyr Ala Ser Val Ile Ile Gln Asn Leu Pro Ala			
305	310	315	320

67/95

Leu Asn Ser Ala Ile Asn Pro Leu Ile Tyr Cys Ile Phe S
 325 330 335
 Leu Cys Ser Pro Cys Lys Val Gln Arg Ser Gln Asp Ser Arg Met Thr
 340 345 350
 Tyr Arg Glu Arg Ser Glu Arg His Glu Met Gln Ile Leu Ser Lys Pro
 355 360 365
 Glu Phe Ile
 370

<210> 90

<211> 1113

<212> DNA

<213> Rat

<400> 90

```

atgccggcca acctcacaga gggcagcttt catgccaacc agactgtgcc gatgctagat    60
tcttcccttg tagcttgcac tgaaattgtg actttcactg aagcgctgga ggctgaggag    120
tggggctcct tctactcgtc cttaagaca gagcagctga taacctgtg ggtcctgttt    180
gtcttcacta ttgtgggaaa ctcggtcgtg ctgttctcca catggagaag aaaaagaaag    240
tccagaatga cttcttttgt gactcaattg gccatcacag actccttcac aggcctgac    300
aacatcctga cagacattat ttggcgattc acgggagact tcatggcccc tgacctggtc    360
tgcagaatcg tccgtacttt acaggttgtc ctgctttatg cctctacctg tgcctgggtg    420
tccctcagca tagacagata ccatgccatc gtttacccea tgaaattcct tcaaggagag    480
aagcaagcca aagtcctcat cggaatagca tggagcctct ctttcctgtt ctccatcccc    540
acactgatca tatttgggaa aaggacactt tccaatgggt aggtacagtg ctgggcactg    600
tggccagacg actcctactg gacccatat atgaccatcg ttgcctttct ggcgtacttc    660
atccccitga caattatcag cgteatctat ggcttgtga tccgaactat ttggattaaa    720
agcaaagccc atgagacggt gatttccaac tgctcagatg gagaactatg ctgcagctac    780
aaccgaggcc tcatctcaaa agcaaaaatc aaggccatca agtacagcat cgtcataatc    840

```

68/95

ctgtgtttca tctgtgctg gaggcctaac ttctcttttg acatgttag
 ctcttccag acaccaagga gcgtttctat gcctctgiga ttatccagaa cctgcctgcc 960
 ttgaacagtg ccattaaccc cctcatctac tgcattctca gcggctccct ctgtctcccc 1020
 tgcaagggtgc aaagatccca ggattccaga atgacgtacc gagagagaag cgagaggcat 1080
 gagatgcaga ttctctccaa gcctgaattc atc 1113

<210> 91

<211> 372

<212> PRT

<213> Rat

<400> 91

Met	Pro	Ala	Asn	Leu	Thr	Glu	Gly	Ser	Phe	His	Ala	Asn	Gln	Thr	Val
				5					10					15	
Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Ser	Pro	Val	Ala	Cys	Thr	Glu	Ile	Val	Thr	Phe
				20				25					30		
Thr	Glu	Ala	Leu	Glu	Ala	Glu	Glu	Trp	Gly	Ser	Phe	Tyr	Ser	Ser	Phe
				35				40					45		
Lys	Thr	Glu	Gln	Leu	Ile	Thr	Leu	Trp	Val	Leu	Phe	Val	Phe	Thr	Ile
				50				55				60			
Val	Gly	Asn	Ser	Val	Val	Leu	Phe	Ser	Thr	Trp	Arg	Arg	Lys	Arg	Lys
				65				70				75		80	
Ser	Arg	Met	Thr	Phe	Phe	Val	Thr	Gln	Leu	Ala	Ile	Thr	Asp	Ser	Phe
				85				90				95			
Thr	Gly	Leu	Ile	Asn	Ile	Leu	Thr	Asp	Ile	Ile	Trp	Arg	Phe	Thr	Gly
				100				105				110			
Asp	Phe	Met	Ala	Pro	Asp	Leu	Val	Cys	Arg	Ile	Val	Arg	Tyr	Leu	Gln
				115				120				125			
Val	Val	Leu	Leu	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr	Val	Leu	Val	Ser	Leu	Ser	Ile

69/95

130	135	140	
Asp Arg Tyr His Ala Ile Val Tyr Pro Met Lys Phe Leu Gln Gly Ala			
145	150	155	160
Glu Lys Gln Ala Lys Val Leu Ile Gly Ile Ala Trp Ser Leu Ser Phe			
	165	170	175
Leu Phe Ser Ile Pro Thr Leu Ile Ile Phe Gly Lys Arg Thr Leu Ser			
	180	185	190
Asn Gly Glu Val Gln Cys Trp Ala Leu Trp Pro Asp Asp Ser Tyr Trp			
	195	200	205
Thr Pro Tyr Met Thr Ile Val Ala Phe Leu Val Tyr Phe Ile Pro Leu			
	210	215	220
Thr Ile Ile Ser Val Ile Tyr Gly Leu Val Ile Arg Thr Ile Trp Ile			
225	230	235	240
Lys Ser Lys Ala His Glu Thr Val Ile Ser Asn Cys Ser Asp Gly Glu			
	245	250	255
Leu Cys Cys Ser Tyr Asn Arg Gly Leu Ile Ser Lys Ala Lys Ile Lys			
	260	265	270
Ala Ile Lys Tyr Ser Ile Val Ile Ile Leu Ala Phe Ile Cys Cys Trp			
	275	280	285
Ser Pro Tyr Phe Leu Phe Asp Met Leu Asp Asn Phe Asn Leu Leu Pro			
	290	295	300
Asp Thr Lys Glu Arg Phe Tyr Ala Ser Val Ile Ile Gln Asn Leu Pro			
305	310	315	320
Ala Leu Asn Ser Ala Ile Asn Pro Leu Ile Tyr Cys Ile Phe Ser Gly			
	325	330	335
Ser Leu Cys Ser Pro Cys Lys Val Gln Arg Ser Gln Asp Ser Arg Met			
	340	345	350
Thr Tyr Arg Glu Arg Ser Glu Arg His Glu Met Gln Ile Leu Ser Lys			
	355	360	365

70/95

Pro Glu Phe Ile

370

<210> 92

<211> 1116

<212> DNA

<213> Rat

<400> 92

```

atgccggcca acctcacaga gggcagcttt catgccaacc agactgtgcc gatgctagat    60
tcttcccttg tagcttgcac tgaattgtg actttcactg aagcgctgga ggctgaggag    120
tggggctcct tctactcgtc cttaagaca gagcagctga taacctgtg ggtcctgttt    180
gtcttacta ttgtgggaaa ctggctcgtg ctgttctcca catggagaag aaaaagaaag    240
tccagaatga ctttctttgt gactcaattg gccatcacag actccttcac aggcctgac    300
aacatcctga cagacattat ttggcgattc acgggagact tcatggcccc tgacctggtc    360
tgcagaatcg tccgtactt acaggttgtc ctgctttatg cctctacctg tgacctggtc    420
tccctcagca tagacagata ccatgccatc gtttacccca tgaaattcct tcaaggagca    480
gagaagcaag ccaaagtcct catcggaata gcatggagcc tctccttctt gttctccatc    540
cccacactga tcatatttgg gaaaaggaca ctttccaatg gtgaggtaca gtgctgggca    600
ctgtggccag acgactccta ctggacccca tataatgacca tegtgcctt tctgggttac    660
ttcatccctt tgacaattat cagcgtcatt tatggccttg tgatccgaac tatttggatt    720
aaaagcaaag cccatgagac ggtgatttcc aactgctcag atggagaact atgctgcagc    780
tacaaccgag gcctcatctc aaaagcaaaa atcaaggcca tcaagtacag catcgtcata    840
atccttgctt tcatctgctg ctggagtcca tacttctctt ttgacatgt agacaacttc    900
aacctccttc cagacaccaa ggagcgcttc tatgcctctg tgattatcca gaacctgcct    960
gccttgaaca gtgccattaa cccctcattc tactgcatct tcagcggctc cctctgctcc   1020
ccctgcaagg tgcaaagatc ccaggattcc agaattgacgt accgagagag aagcgagagg   1080
catgagatgc agattctctc caagcctgaa ttcatc                               1116

```

71/95

<210> 93

<211> 372

<212> PRT

<213> Rat

<400> 93

```

Met Pro Ala Asn Leu Thr Glu Gly Ser Phe His Ala Asn Gln Thr Val
      5              10              15
Pro Met Leu Asp Ser Ser Pro Val Ala Cys Thr Glu Ile Val Thr Phe
      20              25              30
Thr Glu Ala Leu Glu Ala Glu Glu Trp Gly Ser Phe Tyr Ser Ser Phe
      35              40              45
Lys Thr Glu Gln Leu Ile Thr Leu Trp Val Leu Phe Val Phe Thr Ile
      50              55              60
Val Gly Asn Ser Val Val Leu Phe Ser Thr Trp Arg Arg Lys Arg Lys
      65              70              75              80
Ser Arg Met Thr Phe Phe Val Thr Gln Leu Ala Ile Thr Asp Ser Phe
      85              90              95
Thr Gly Leu Ile Asn Ile Leu Thr Asp Ile Ile Trp Arg Phe Thr Gly
      100             105             110
Asp Phe Met Ala Pro Asp Leu Val Cys Arg Ile Val Arg Tyr Leu Gln
      115             120             125
Val Val Leu Leu Tyr Ala Ser Thr Tyr Val Leu Val Ser Leu Ser Ile
      130             135             140
Asp Arg Tyr His Ala Ile Val Tyr Pro Met Lys Phe Leu Gln Gly Ala
      145             150             155             160
Glu Lys Gln Ala Lys Val Leu Ile Gly Ile Ala Trp Ser Leu Ser Phe
      165             170             175
Leu Phe Ser Ile Pro Thr Leu Ile Ile Phe Gly Lys Arg Thr Leu Ser

```

72/95

180	185	1
Asn Gly Glu Val Gln Cys Trp Ala Leu Trp Pro Asp Asp Ser Tyr Trp		
195	200	205
Thr Pro Tyr Met Thr Ile Val Ala Phe Leu Val Tyr Phe Ile Pro Leu		
210	215	220
Thr Ile Ile Ser Val Ile Tyr Gly Leu Val Ile Arg Thr Ile Trp Ile		
225	230	235
Lys Ser Lys Ala His Glu Thr Val Ile Ser Asn Cys Ser Asp Gly Glu		
245	250	255
Leu Cys Cys Ser Tyr Asn Arg Gly Leu Ile Ser Lys Ala Lys Ile Lys		
260	265	270
Ala Ile Lys Tyr Ser Ile Val Ile Ile Leu Ala Phe Ile Cys Cys Trp		
275	280	285
Ser Pro Tyr Phe Leu Phe Asp Met Leu Asp Asn Phe Asn Leu Leu Pro		
290	295	300
Asp Thr Lys Glu Arg Phe Tyr Ala Ser Val Ile Ile Gln Asn Leu Pro		
305	310	315
Ala Leu Asn Ser Ala Ile Asn Pro Leu Ile Tyr Cys Ile Phe Ser Gly		
325	330	335
Ser Leu Cys Ser Pro Cys Lys Val Arg Arg Ser Gln Asp Ser Arg Met		
340	345	350
Thr Tyr Arg Glu Arg Ser Glu Arg His Glu Met Gln Ile Leu Ser Lys		
355	360	365
Pro Glu Phe Ile		
370		

<210> 94

<211> 1116

<212> DNA

73/95

<213> Rat

<400> 94

```

atgccggcca acctcacaga gggcagcttt catgccaacc agactgtgcc gatgctagat    60
tcttccccctg tagcttgac tgaaattgig actttcactg aagcgctgga ggctgaggag   120
tggggtcctt tctactcgtc cttaagaca gagcagctga taacctgig ggtcctgttt   180
gtcttacta ttgtgggaaa ctcggtcgtg ctgttctcca catggagaag aaaaagaaag   240
tcagaatga cttctttgt gactcaatig gccatcacag actccttcac aggctgac   300
aacatcctga cagacattat ttggcgattc acgggagact tcatggcccc tgacctggtc   360
tgcagaatcg tccgtactt acaggttgtc ctgctttatg cctctacctg tgctctggtg   420
tccctcagca tagacagata ccatgccatc gtttacccca tgaaattcct tcaaggagca   480
gagaagcaag ccaaagtcct catcggaata gcatggagcc tctccttcct gttctccatc   540
cccacactga tcatatttgg gaaaaggaca ctttccaatg gtgaggtaga gtgctgggca   600
ctgtggccag acgactccta ctggacccca tataatgacca tcgttgccit tctggtgtac   660
ttcatccctt tgacaattat cagcgtcatc tatggccttg tgatccgaac tatttggatt   720
aaaagcaaag ccatgagac ggtgatttcc aactgctcag atggagaact atgctgcagc   780
tacaaccgag gccatcatctc aaaagcaaaa atcaaggcca tcaagtacag catcgctata   840
atccttgcctt tcatctgctg ctggagtcca tacttctctt ttgacatgtt agacaacttc   900
aacctccttc cagacacca ggagcgtttc tatgcctctg tgattatcca gaacctgcct   960
gccttgaaca gtgccattaa cccctcctc tactgcatct tcagcggctc cctctgctcc  1020
ccctgcaagg tgcaagatc ccaggattcc agaattgacgt accgagagag aagcgagagg  1080
catgagatgc agattctctc caagcctgaa ttcatc                               1116

```

<210> 95

<211> 371

<212> PRT

<213> Human

<400> 95

Met	Pro	Ala	Asn	Phe	Thr	Glu	Gly	Ser	Phe	Asp	Ser	Ser	C			
				5					10						15	
Gln	Thr	Leu	Asp	Ser	Ser	Pro	Val	Ala	Cys	Thr	Glu	Thr	Val	Thr	Phe	
			20					25					30			
Thr	Glu	Val	Val	Glu	Gly	Lys	Glu	Trp	Gly	Ser	Phe	Tyr	Tyr	Ser	Phe	
		35					40					45				
Lys	Thr	Glu	Gln	Leu	Ile	Thr	Leu	Trp	Val	Leu	Phe	Val	Phe	Thr	Ile	
	50					55				60						
Val	Gly	Asn	Ser	Val	Val	Leu	Phe	Ser	Thr	Trp	Arg	Arg	Lys	Lys	Lys	
65					70					75					80	
Ser	Arg	Met	Thr	Phe	Phe	Val	Thr	Gln	Leu	Ala	Ile	Thr	Asp	Ser	Phe	
			85					90					95			
Thr	Gly	Leu	Val	Asn	Ile	Leu	Thr	Asp	Ile	Ile	Trp	Arg	Phe	Thr	Gly	
		100						105				110				
Asp	Phe	Thr	Ala	Pro	Asp	Leu	Val	Cys	Arg	Val	Val	Arg	Tyr	Leu	Gln	
	115							120				125				
Val	Val	Leu	Leu	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr	Val	Leu	Val	Ser	Leu	Ser	Ile	
	130					135				140						
Asp	Arg	Tyr	His	Ala	Ile	Val	Tyr	Pro	Met	Lys	Phe	Leu	Gln	Gly	Glu	
145					150					155					160	
Lys	Gln	Ala	Arg	Val	Leu	Ile	Val	Ile	Ala	Trp	Ser	Leu	Ser	Phe	Leu	
		165						170				175				
Phe	Ser	Ile	Pro	Thr	Leu	Ile	Ile	Phe	Gly	Lys	Arg	Thr	Leu	Ser	Asn	
		180						185				190				
Gly	Glu	Val	Gln	Cys	Trp	Ala	Leu	Trp	Pro	Asp	Asp	Ser	Tyr	Trp	Thr	
	195							200				205				
Pro	Tyr	Met	Thr	Ile	Val	Ala	Phe	Leu	Val	Tyr	Phe	Ile	Pro	Leu	Thr	
	210					215				220						
Ile	Ile	Ser	Ile	Met	Tyr	Gly	Ile	Val	Ile	Arg	Thr	Ile	Trp	Ile	Lys	

75/95

225 230 235
 Ser Lys Thr Tyr Glu Thr Val Ile Ser Asn Cys Ser Asp Gly Lys Leu
 245 250 255
 Cys Ser Ser Tyr Asn Arg Gly Leu Ile Ser Lys Ala Lys Ile Lys Ala
 260 265 270
 Ile Lys Tyr Ser Ile Ile Ile Ile Leu Ala Phe Ile Cys Cys Trp Ser
 275 280 285
 Pro Tyr Phe Leu Phe Asp Ile Leu Asp Asn Phe Asn Leu Leu Pro Asp
 290 295 300
 Thr Gln Glu Arg Phe Tyr Ala Ser Val Ile Ile Gln Asn Leu Pro Ala
 305 310 315 320
 Leu Asn Ser Ala Ile Asn Pro Leu Ile Tyr Cys Val Phe Ser Ser Ser
 325 330 335
 Ile Ser Phe Pro Cys Arg Glu Gln Arg Ser Gln Asp Ser Arg Met Thr
 340 345 350
 Phe Arg Glu Arg Thr Glu Arg His Glu Met Gln Ile Leu Ser Lys Pro
 355 360 365
 Glu Phe Ile
 370

<210> 96

<211> 1116

<212> DNA

<213> Human

<400> 96

atgccagcca acttacaga gggcagcttc gattccagtg ggaccgggca gacgctggat 60
 tcttccccag tggcttgac tgaacagtg acttttactg aagtgggtga aggaaaggaa 120
 tggggttcct tctactactc cttaaagact gagcaatiga taactctgtg ggctctcttt 180

76/95

gtttttacca ttgttggaaa ctccgttgig cttttttcca catggagg
 tcaagaatga ccttctttgt gactcagctg gccatcacag attctttcac aggactggtc 300
 aacatcttga cagatattat ttggcgattc actggagact tcacggcacc tgacctgggtt 360
 tgccgagtgg tccgctattt gcaggtttgt ctgctctacg cctctaccta cgtcctgggtg 420
 tccctcagca tagacagata ccatgccatc gtctacccca tgaagttcct tcaaggagaa 480
 aagcaagcca gggctctcat tgtgatcgcc tggagcctgt cttttctgtt ctccattccc 540
 accctgatca tatttgggaa gaggacactg tccaacggtg aagtgcagtg ctgggccctg 600
 tggcctgacg actcctactg gaccccatac atgaccatcg tggccttcct ggtgtacttc 660
 atccctctga caatcatcag catcatgtat ggcatgttga tccgaactat ttggattaaa 720
 agcaaaacct acgaaacagt gattccaac tgctcagatg ggaaactgtg cagcagctat 780
 aaccgaggac tcattctcaa ggcaaaaatc aaggctatca agtatagcat catcatcatt 840
 ctggccttca tctgtgttg gagtccatac ttctgtttg acattttgga caatttcaac 900
 ctcttccag acaccagga gcgtttctat gcctctgtga tcattcagaa cctgccagca 960
 ttgaatagtg ccatcaacce cctcatctac tgtgtcttca gcagctccat ctctttcccc 1020
 tgcagggagc aaagatcaca ggattccaga atgacgttcc gggagagaac tgagaggcat 1080
 gagatgcaga ttctgtccaa gccagaattc atctag. 1116

<210> 97

<211> 371

<212> PRT

<213> Human

<400> 97

Met	Pro	Ala	Asn	Phe	Thr	Glu	Gly	Ser	Phe	Asp	Ser	Ser	Gly	Thr	Gly
			5					10					15		
Gln	Thr	Leu	Asp	Ser	Ser	Pro	Val	Ala	Cys	Thr	Glu	Thr	Val	Thr	Phe
			20					25					30		
Thr	Glu	Val	Val	Glu	Gly	Lys	Glu	Trp	Gly	Ser	Phe	Tyr	Tyr	Ser	Phe
			35				40						45		

77/95

Lys Thr Glu Gln Leu Ile Thr Leu Trp Val Leu Phe Val F
 50 55 60
 Val Gly Asn Ser Val Val Leu Phe Ser Thr Trp Arg Arg Lys Lys Lys
 65 70 75 80
 Ser Arg Met Thr Phe Phe Val Thr Gln Leu Ala Ile Thr Asp Ser Phe
 85 90 95
 Thr Gly Leu Val Asn Ile Leu Thr Asp Ile Asn Trp Arg Phe Thr Gly
 100 105 110
 Asp Phe Thr Ala Pro Asp Leu Val Cys Arg Val Val Arg Tyr Leu Gln
 115 120 125
 Val Val Leu Leu Tyr Ala Ser Thr Tyr Val Leu Val Ser Leu Ser Ile
 130 135 140
 Asp Arg Tyr His Ala Ile Val Tyr Pro Met Lys Phe Leu Gln Gly Glu
 145 150 155 160
 Lys Gln Ala Arg Val Leu Ile Val Ile Ala Trp Ser Leu Ser Phe Leu
 165 170 175
 Phe Ser Ile Pro Thr Leu Ile Ile Phe Gly Lys Arg Thr Leu Ser Asn
 180 185 190
 Gly Glu Val Gln Cys Trp Ala Leu Trp Pro Asp Asp Ser Tyr Trp Thr
 195 200 205
 Pro Tyr Met Thr Ile Val Ala Phe Leu Val Tyr Phe Ile Pro Leu Thr
 210 215 220
 Ile Ile Ser Ile Met Tyr Gly Ile Val Ile Arg Thr Ile Trp Ile Lys
 225 230 235 240
 Ser Lys Thr Tyr Glu Thr Val Ile Ser Asn Cys Ser Asp Gly Lys Leu
 245 250 255
 Cys Ser Ser Tyr Asn Arg Gly Leu Ile Ser Lys Ala Lys Ile Lys Ala
 260 265 270
 Ile Lys Tyr Ser Ile Ile Ile Ile Leu Ala Phe Ile Cys Cys Trp Ser

78/95

275	280	285
Pro Tyr Phe Leu Phe Asp Ile Leu Asp Asn Phe Asn Leu Leu Pro Asp		
290	295	300
Thr Gln Glu Arg Phe Tyr Ala Ser Val Ile Ile Gln Asn Leu Pro Ala		
305	310	315
Leu Asn Ser Ala Ile Asn Pro Leu Ile Tyr Cys Val Phe Ser Ser Ser		
325	330	335
Ile Ser Phe Pro Cys Arg Glu Arg Arg Ser Gln Asp Ser Arg Met Thr		
340	345	350
Phe Arg Glu Arg Thr Glu Arg His Glu Met Gln Ile Leu Ser Lys Pro		
355	360	365
Glu Phe Ile		
370		

<210> 98

<211> 1116

<212> DNA

<213> Human

<400> 98

atgccagcca acttacaga gggcagcttc gattccagtg ggaccgggca gacgctggat	60
tcttccccag tggcttgac tgaaacagtg acttttactg aagtgggtga aggaaaggaa	120
tggggttcct tctactactc cttaagact gagcaattga taactctgtg ggtcctcttt	180
gtttttacca ttgttgaaa ctcggttggtg cttttttcca catggaggag aaagaagaag	240
tcaagaatga ctttctttgt gactcagctg gccatcacag attctttcac aggactggtc	300
aacatcttga cagatattaa ttggcgattc actggagact tcacggcacc tgacctggtt	360
tgccgagtgg tccgctatit gcaggltgtg ctgctctacg cctctacctt cgtcctgggtg	420
tccctcagca tagacagata ccatgccatc gtctacccca tgaagttcct tcaaggagaa	480
aagcaagcca gggctctcat tgtgatgcc tggagcctgt cttttctgtt ctccattccc	540

79/95

```

accctgatca tatttgggaa gaggacactg tccaacggtg aagtgcagl _ _ _ _
tggcctgacg actcctactg gaccccatac atgaccatcg tggccttcc t ggtgtacttc 660
atccctctga caatcatcag catcatgtat ggcatitgtga tccgaactat ttggattaaa 720
agcaaaacct acgaaacagt gatttccaac tgcicagatg ggaaactigt cagcagctat 780
aaccgaggac tcatctcaaa ggcaaaaatc aaggctatca agtatagcat catcatcatt 840
cttgccttca tctgctgttg gattccatac ttctgtttg acattttgga caatttcaac 900
ctccttccag acaccagga gcgtttctat gcctctgtga tcattcagaa cctgccagca 960
ttgaatagtg ccatcaacct cctcatctac tgtgtcttca gcagctccat ctctttcccc 1020
tgcagggagc gaagatcaca ggattccaga atgacgttcc gggagagaac cgagaggcat 1080
gagatgcaga ttctgtccaa gccagaattc atctag 1116

```

<210> 99

<211> 1116

<212> DNA

<213> Human

<400> 99

```

atgccagcca acttcacaga gggcagcttc gattccagtg ggaccgggca gacgctggat 60
cttccccag tggcttgac tgaacacgtg acttttactg aagtgggtga aggaaaggaa 120
tggggttcc tctactactc cttaagact gagcaattga taactctgtg ggtcctcttt 180
gtttttacca ttgttgaaa ctccgttgtg cttttttcca catggaggag aaagaagaag 240
tcaagaatga ctttctttgt gactcagctg gccatcacag attctttcac aggactggtc 300
aacatcttga cagatattat ttggcgattc actggagact tcacggcacc tgacctggtt 360
tgccgagtgg tccgtatatt gcaggttgtg ctgctctacg cctctacctt cgtcctgggtg 420
tccctcagca tagacagata ccatgccatc gtctacccca tgaagttcct tcaaggagaa 480
aagcaagcca gggctctcat tgtgatgcc tggagcctgt cttttctgtt ctccattccc 540
accctgatca tatttgggaa gaggacactg tccaacggtg aagtgcagtg ctgggccctg 600
tggcctgacg actcctactg gaccccatac atgaccatcg tggccttct ggtgtacttc 660
atccctctga caatcatcag catcatgtat ggcatitgtga tccgaactat ttggattaaa 720

```

80/95

```

agcaaaacct acgaaacagt gatttccaac tgcicagatg ggaaactg
aaccgaggac tcattctaaa ggcaaaaatc aaggctatca agtatagcat catcatcatt 840
cttgccitca tctgctgttg gattccatac ttctgtttg acattttgga caatttcaac 900
ctctctccag acaccagga gcgtttctat gccctctgtga tcattcagaa cctgccagca 960
ttgaatagtg ccatcaaccc cctcatctac tgtgtcttca gcagctccat ctctttcccc 1020
tgcaggagc aaagatcaca ggattccaga atgacgttcc gggagagaac tgagaggcat 1080
gagatgcaga ttctgtccaa gccagaattc atctag 1116

```

<210> 100

<211> 1113

<212> DNA

<213> Human

<400> 100

```

atgccagcca acttcacaga gggcagctt gattccagtg ggaccgggca gacgctggat 60
tcttccccag tggcttgac tgaacacagt acttttactg aagtgggtgga aggaaaggaa 120
tggggttcc tctactactc cttaagact gagcaattga taactctgtg ggtcctcttt 180
gtttttacca ttgttgga aa ctcgtttgt cttttttcca catggaggag aaagaagaag 240
tcaagaatga ccttctttgt gactcagctg gccatcacag attctttcac aggactggtc 300
aacatcttga cagatattat ttggcgattc actggagact tcacggcacc tgacctgggt 360
tgccgagtgg tccgctatit gcaggttgt ctcctgtacg cctctaccta cgtcctgggt 420
tccctcagca tagacagata ccatgccatc gtctacccca tgaagttcct tcaaggagaa 480
aagcaagcca gggctctcat tgtgatcgcc tggagcctgt cttttctgtt ctccattccc 540
acctgatca tatttgggaa gaggacactg tccaacgggt aagtgcagt cttggccctg 600
tgccctgacg actcctactg gacccatac atgaccatcg tggccttctt ggtgtlactt 660
atccctctga caatcatcag catcatgtat ggcatgtg tccgaactat ttggattaaa 720
agcaaaacct acgaaacagt gatttccaac tgcicagatg ggaaactgtg cagcagctat 780
aaccgaggac tcattctaaa ggcaaaaatc aaggctatca agtatagcat catcatcatt 840
cttgccitca tctgctgttg gattccatac ttctgtttg acattttgga caatttcaac 900

```


81/95

ctccttccag acacccagga gcgtttctat gcctctgtga tcattcaga
 ttgaatagtg ccatcaaccc cctcatctac tgtgtcttca gcagctccat ctccttcccc 1020
 tgcaggagc aaagatcaca ggattccaga atgacgttcc gggagagaac tgagaggcat 1080
 gagatgcaga ttctgtccaa gccagaattc atc 1113

<210> 101

<211> 1113

<212> DNA

<213> Human

<400> 101

atgccagcca acttcacaga gggcagctc gattccagtg ggaccgggca gacgctggat 60
 tcttccccag tggcttgcaac tgaacacagt acttttactg aagtgggtga aggaaaggaa 120
 tggggttcct tctactactc ctttaagact gagcaattga taactctgtg ggtcctcttt 180
 gtttttacca ttgttggaaa ctccgttgtg cttttttcca catggaggag aaagaagaag 240
 tcaagaatga ccttctttgt gactcagctg gccatcacag attctttcac aggactggtc 300
 aacatcttga cagatattat ttggcgattc actggagact tcacggcacc tgacctgggt 360
 tgccgagtgg tccgctattt gcaggttgtg ctgctctacg cctctaccta cgtcctgggtg 420
 tccctcagca tagacagata ccatgccatc gtctacccca tgaagtccct tcaaggagaa 480
 aagcaagcca gggctctcat tgtgatcgcc tggagcctgt cttttctgtt ctccattccc 540
 accctgatca tatttgggaa gaggacactg tccaacggtg aagtgcagtg ctgggccctg 600
 tggcctgacg actcctactg gacccatac atgaccatcg tggccttcct ggtgtacttc 660
 atccctctga caatcatcag catcatgtat ggcatigtga tccgaactat ttggattaaa 720
 agcaaacct acgaaacagt gatttccaac tgcctcagatg ggaaactgtg cagcagctat 780
 aaccgaggac tcattctcaa ggcaaaaatc aaggtatca agtatagcat catcatcatt 840
 cttgccttca tctgtgtttg gattccatac ttctgtttg acatttttga caatttcaac 900
 ctccttccag acacccagga gcgtttctat gcctctgtga tcattcagaa cctgccagca 960
 ttgaatagtg ccatcaaccc cctcatctac tgtgtcttca gcagctccat ctccttcccc 1020
 tgcaggagc gaagatcaca ggattccaga atgacgttcc gggagagaac cgagaggcat 1080

82/95

gagatgcaga ttctgtccaa gccagaattc atc

<210> 102

<211> 371

<212> PRT

<213> Human

<400> 102

Met	Pro	Ala	Asn	Phe	Thr	Glu	Gly	Ser	Phe	Asp	Ser	Ser	Gly	Thr	Gly
			5					10					15		
Gln	Thr	Leu	Asp	Ser	Ser	Pro	Val	Ala	Cys	Thr	Glu	Thr	Val	Thr	Phe
			20					25					30		
Thr	Glu	Val	Val	Glu	Gly	Lys	Glu	Trp	Gly	Ser	Phe	Tyr	Tyr	Ser	Phe
			35				40					45			
Lys	Thr	Glu	Gln	Leu	Ile	Thr	Leu	Trp	Val	Leu	Phe	Val	Phe	Thr	Ile
			50				55				60				
Val	Gly	Asn	Ser	Val	Val	Leu	Phe	Ser	Thr	Trp	Arg	Arg	Lys	Lys	Lys
			65			70				75				80	
Ser	Arg	Met	Thr	Phe	Phe	Val	Thr	Gln	Leu	Ala	Ile	Thr	Asp	Ser	Phe
						85				90				95	
Thr	Gly	Leu	Val	Asn	Ile	Leu	Thr	Asp	Ile	Asn	Trp	Arg	Phe	Thr	Gly
						100				105				110	
Asp	Phe	Thr	Ala	Pro	Asp	Leu	Val	Cys	Arg	Val	Val	Arg	Tyr	Leu	Gln
						115				120			125		
Val	Val	Leu	Leu	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr	Val	Leu	Val	Ser	Leu	Ser	Ile
						130				135			140		
Asp	Arg	Tyr	His	Ala	Ile	Val	Tyr	Pro	Met	Lys	Phe	Leu	Gln	Gly	Glu
						145				150			155		160
Lys	Gln	Ala	Arg	Val	Leu	Ile	Val	Ile	Ala	Trp	Ser	Leu	Ser	Phe	Leu

83/95

165 170
 Phe Ser Ile Pro Thr Leu Ile Ile Phe Gly Lys Arg Thr Leu Ser Asn
 180 185 190
 Gly Glu Val Gln Cys Trp Ala Leu Trp Pro Asp Asp Ser Tyr Trp Thr
 195 200 205
 Pro Tyr Met Thr Ile Val Ala Phe Leu Val Tyr Phe Ile Pro Leu Thr
 210 215 220
 Ile Ile Ser Ile Met Tyr Gly Ile Val Ile Arg Thr Ile Trp Ile Lys
 225 230 235 240
 Arg Lys Thr Tyr Glu Thr Val Ile Ser Asn Cys Ser Asp Gly Lys Leu
 245 250 255
 Cys Ser Ser Tyr Asn Arg Gly Leu Ile Ser Lys Ala Lys Ile Lys Ala
 260 265 270
 Ile Lys Tyr Ser Ile Ile Ile Ile Leu Ala Phe Ile Cys Cys Trp Ser
 275 280 285
 Pro Tyr Phe Leu Phe Asp Ile Leu Asp Asn Phe Asn Leu Leu Pro Asp
 290 295 300
 Thr Gln Glu Arg Phe Tyr Ala Ser Val Ile Ile Gln Asn Leu Pro Ala
 305 310 315 320
 Leu Asn Ser Ala Ile Asn Pro Leu Ile Tyr Cys Val Phe Ser Ser Ser
 325 330 335
 Ile Ser Phe Pro Cys Arg Glu Arg Arg Ser Gln Asp Ser Arg Met Thr
 340 345 350
 Phe Arg Glu Arg Thr Glu Arg His Glu Met Gln Ile Leu Ser Lys Pro
 355 360 365
 Glu Phe Ile
 370

<210> 103

84/95

<211> 1113

<212> DNA

<213> Human

<400> 103

```

atgccagcca acttcacaga gggcagcttc gattccagtg ggaccgggca gacgctggat    60
tcttccccag tggcttgac  tgaacagtg  acttttactg aagtgggtgga aggaaaggaa   120
tggggttcct tctactactc cttaagact  gagcaattga taactctgtg ggicctcttt   180
gttttlacca ttgttggaaa ctccgttgtg cttttttcca catggaggag aaagaagaag   240
tcaagaatga cttcttttgt gactcagctg gccatcacag attctttcac aggactggtc   300
aacatcttga cagatattaa ttggcgattc actggagact tcacggcacc tgacctgggt   360
tgccgagtgg tccgctatit gcaggttgtg ctgctctacg cctctaccta cgtcctgggt   420
tccctcagca tagacagata ccatgccatc gtctacccca tgaagtccct tcaaggagaa   480
aagcaagcca gggtcctcat tgtgatcgcc tggagcctgt cttttctgtt ctccattccc   540
acctgatca  tatttgggaa gaggacactg tccaacggtg aagtgcagtg ctgggccctg   600
tggcctgacg actcctactg gacccatac  atgaccatcg tggcctttct ggtgtacttc   660
atccctctga caatcatcag catcatgtat ggcatgtga  tccgaactat ttggattaaa   720
aggaaaacct acgaaacagt gatttccaac tgctcagatg ggaaactgtg cagcagctat   780
aaccgaggac tcatctcaaa ggcaaaaatc aaggctatca agtatagcat catcatcatt   840
cttgccctca tctgtctgtg gattccatac ttctgtttg acattttgga caatttcaac   900
ctccttccag acaccagga gcgtttctat gcctctgtga tcattcagaa cctgccagca   960
ttgaatagtg ccatcaaccc cctcatctac tgtgtcttca gcagctccat ctctttcccc  1020
tgcagggagc gaagatcaca ggattccaga atgacgttcc gggagagAAC cgagaggcat  1080
gagatgcaga ttctgtccaa gccagaattc atc                                1113

```

<210> 104

<211> 371

<212> PRT

<213> Human

85/95

<400> 104

Met Pro Ala Asn Phe Thr Glu Gly Ser Phe Asp Ser Ser Gly Thr Gly
 5 10 15
 Gln Thr Leu Asp Ser Ser Pro Val Ala Cys Thr Glu Thr Val Thr Phe
 20 25 30
 Thr Glu Val Val Glu Gly Lys Glu Trp Gly Ser Phe Tyr Tyr Ser Phe
 35 40 45
 Lys Thr Glu Gln Leu Ile Thr Leu Trp Val Leu Phe Val Phe Thr Ile
 50 55 60
 Val Gly Asn Ser Val Val Leu Phe Ser Thr Trp Arg Arg Lys Lys Lys
 65 70 75 80
 Ser Arg Met Thr Phe Phe Val Thr Gln Leu Ala Ile Thr Asp Ser Phe
 85 90 95
 Thr Gly Leu Val Asn Ile Leu Thr Asp Ile Ile Trp Arg Phe Thr Gly
 100 105 110
 Asp Phe Thr Ala Pro Asp Leu Val Cys Arg Val Val Arg Tyr Leu Gln
 115 120 125
 Val Val Leu Leu Tyr Ala Ser Thr Tyr Val Leu Val Ser Leu Ser Ile
 130 135 140
 Asp Arg Tyr His Ala Ile Val Tyr Pro Met Lys Phe Leu Gln Gly Glu
 145 150 155 160
 Lys Gln Ala Arg Val Leu Ile Val Ile Ala Trp Ser Leu Ser Phe Leu
 165 170 175
 Phe Ser Ile Pro Thr Leu Ile Ile Phe Gly Lys Arg Thr Leu Ser Asn
 180 185 190
 Gly Glu Val Gln Cys Trp Ala Leu Trp Pro Asp Asp Ser Tyr Trp Thr
 195 200 205
 Pro Tyr Met Thr Ile Val Ala Phe Leu Val Tyr Phe Ile Pro Leu Thr

86/95

210	215	220	
Ile Ile Ser Ile Met Tyr Gly Ile Val Ile Arg Thr Ile Trp Ile Lys			
225	230	235	240
Arg Lys Thr Tyr Glu Thr Val Ile Ser Asn Cys Ser Asp Gly Lys Leu			
	245	250	255
Cys Ser Ser Tyr Asn Arg Gly Leu Ile Ser Lys Ala Lys Ile Lys Ala			
	260	265	270
Ile Lys Tyr Ser Ile Ile Ile Ile Leu Ala Phe Ile Cys Cys Trp Ser			
	275	280	285
Pro Tyr Phe Leu Phe Asp Ile Leu Asp Asn Phe Asn Leu Leu Pro Asp			
	290	295	300
Thr Gln Glu Arg Phe Tyr Ala Ser Val Ile Ile Gln Asn Leu Pro Ala			
305	310	315	320
Leu Asn Ser Ala Ile Asn Pro Leu Ile Tyr Cys Val Phe Ser Ser Ser			
	325	330	335
Ile Ser Phe Pro Cys Arg Glu Arg Arg Ser Gln Asp Ser Arg Met Thr			
	340	345	350
Phe Arg Glu Arg Thr Glu Arg His Glu Met Gln Ile Leu Ser Lys Pro			
	355	360	365
Glu Phe Ile			
370			

<210> 105

<211> 1113

<212> DNA

<213> Human

<400> 105

atgccagcca acttcacaga gggcagcttc gattccagtg ggaccgggca gacgctggat 60

87/95

```

tcctccccag tggcttgac tgaacacagtg acttttactg aagtgggtg
tggggttctt tctactactc cttaagact gagcaattga taactctgtg ggtcctcttt 180
gtttttacca ttgttgaaa ctccgttgtg cttttttcca catggaggag aaagaagaag 240
tcaagaatga cttcttttgt gactcagctg gccatcacag attctttcac aggactggtc 300
aacatcttga cagatattat ttggcgattc actggagact tcacggcacc tgacctgggt 360
tgccgagtg tccgctatct gcaggttgtg ctgctctacg cctctacctt cgtcctgggtg 420
tccctcagca tagacagata ccatgccatc gtctacccca tgaagttcct tcaaggagaa 480
aagcaagcca ggttctctat tgtgatcgcc tggagcctgt cttttctgtt ctccattccc 540
acctgatca tatttgaggaa gaggacactg tccaacgggtg aagtgcagtg ctgggccctg 600
tgccctgacg actcctactg gaccccatc atgaccatcg tggcctttct ggtgtacttc 660
atccctctga caatcatcag catcatgtat ggcatgttga tccgaactat ttggattaaa 720
aggaaaacct acgaaacagt gatttccaac tgctcagatg ggaaactgtg cagcagctat 780
aaccgaggac tcattctcaa ggcaaaaatc aaggctatca agtatagcat catcatcatt 840
cttgccctca tctgctgttg gattccatc ttctgtttg acattttgga caatttcaac 900
ctccttccag acaccagga gcgtttctat gcctctgtga tcattcagaa cctgccagca 960
ttgaatagtg ccatcaaccc cctcatctac tgtgtcttca gcagctccat ctctttcccc 1020
tgcagggagc gaagatcaca ggattccaga atgacgttcc gggagagaac cgagaggcat 1080
gagatgcaga ttctgtccaa gccagaattc atc 1113

```

<210> 106

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding human TGR2
3-1A

<400> 106

88/95

ctatttggat taaaaggaaa acctacgaaa cag

<210> 107

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding human TGR2
3-1A

<400> 107

ctgtttcgta ggttttcctt ttaatccaaa tag 33

<210> 108

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding human TGR2
3-1C

<400> 108

cttgacagat attatttggc gattcactgg 30

<210> 109

<211> 30

<212> DNA

89/95

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding human TGR2
3-1C

<400> 109

ccagtgaatc gccaaataat atctgtcaag

30

<210> 110

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding human TGR2
3-1D

<400> 110

cccctgcagg gagcgaagat cacaggattc c

31

<210> 111

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding human TGR2
3-1D

90/95

<400> 111

ggaatcctgt gatcttcgct ccctgcaggg g

31

<210> 112

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding human TGR2
3-1B

<400> 112

ctatttggat taaaaggaaa acctacgaaa cag

33

<210> 113

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding human TGR2
3-1B

<400> 113

ctgtttcgta ggttttcctt ttaatccaaa tag

33

<210> 114

91/95

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify partial DNA encoding human TGR23-2

<400> 114

atgccagcca acttcaca

18

<210> 115

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify partial DNA encoding human TGR23-2

<400> 115

ttcactggag acttcacggc a

21

<210> 116

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

92/95

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA

5

<400> 116

ttccttcaag gagcagagaa gcaagccaaa g

31

<210> 117

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding rat TGR23-

5

<400> 117

ctttggcttg cttctctgct ccttgaagga a

31

<210> 118

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify partial DNA encoding ra

t TGR23-1

<400> 118

gtcgacatgc cggccaacct cacagagggc agcttt

36

93/95

<210> 119

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify partial DNA encoding rat TGR23-1

<400> 119

actagtttag atgaattcag gcttggagag aatctg

36

<210> 120

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 120

gacattattt ggcgattcac gg

22

<210> 121

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

94/95

<220>

<223> Primer

<400> 121

tgtaagtagc ggacgattct gc

22

<210> 122

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 122

ttggagttat ccggtcctct ctccaag

28

<210> 123

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide

<400> 123

gacccacaga gttatcaatt

20

<210> 124

95/95

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide

<400> 124

ttaactattg agacaccag

20